

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Participação das endotelinas endógenas na mediação da
lesão pulmonar induzida por ácido olêico em
camundongos.**

CLÁUDIO LAURENTINO GUIMARÃES

**Florianópolis – SC
Novembro - 2002**

CLÁUDIO LAURENTINO GUIMARÃES

PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS ENDÓGENAS NA MEDIAÇÃO
DA LESÃO PULMONAR INDUZIDA POR ÁCIDO OLÊICO EM
CAMUNDONGOS.

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, sub-
área Farmacologia Autônômica. Curso de Pós-
graduação em Farmacologia, Centro de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis – SC
Novembro - 2002

ORIENTADOR

Prof. Dr. Giles Alexander Rae

A maioria dos experimentos desse trabalho de pesquisa foi realizado no Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina. O estudo histopatológico foi conduzido no Laboratório de Patologia da Universidade Regional de Blumenau.

Este projeto de pesquisa, contou com o imperativo auxílio financeiro do **Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPq**.

DEDICAÇÕES

Dedico este trabalho, *in memoriam*, a:

Clemente João Laurentino – Avô materno

e à **Martha Werner Guimarães** – Avó paterna

“Orientadores que me ensinaram o quanto a vida é simples e maravilhosa, tão saborosa como um simples sorvete”

Aos meus pais,

Neri Nicolau Guimarães e Diná Laurentino Guimarães

“Exemplos de vida e dedicação aos filhos”

E, ao meu sobrinho,

Felipe L. Guimarães Ávila dos Santos

“Por seu amor e carinho a mim dedicado”

AGRADECIMENTOS

Durante o meu doutoramento, enfrentei diversas barreiras impostas pelo trabalho e pela vida. Sem a compreensão, o carinho, colaboração e atenção dos amigos, este trabalho não teria ocorrido. O meu sincero agradecimento, aos amigos:

Andréia Janine de Oliveira (pela análise histopatológica)

Alcília Helena Maia

Anna Paula Piovezan

Danilo Ferreira & José Carlos Dias (pela elaboração da figura 1)

Gladys Rosane Thomé Vieira

Kerlei Tatajiba Zanca & Rosilene dos Santos

Kleber dos Santos Luiz

Michel Otuke (pela análise da MPO)

Patrícia Gonçalves Trentin

Pedro Cabral Filho

Sandro da Silva

Tânia Silvia Fröde

Vânia Ferreira (pela ajuda na aquisição bibliográfica)

Agradecimentos Institucionais:

À **Universidade Regional de Blumenau (FURB)**, pela concessão de afastamento para cursar doutorado.

Aos funcionários da Biblioteca Central da FURB

Ao Departamento de Ciências Naturais (FURB)

Aos Docentes do Departamento de Farmacologia da UFSC

Ao CNPq, pela Bolsa de Estudos

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Giles Alexander Rae** sempre orientador e compreensivo nas horas mais difíceis.

SUMÁRIO

	Página
Lista de abreviações	X
Lista de figuras	XII
Lista de tabelas	XV
Resumo	XVI
Abstract	XVII
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Síndrome da Angústia Respiratória Aguda	01
1.2. Endotelinas	07
1.3. Endotelinas no trato respiratório	11
1.3.1. Metabolismo, distribuição e receptores das endotelinas no trato respiratório	11
1.3.2. Efeitos farmacológicos endotelinas no trato respiratório	14
1.3.3. Implicações fisiopatológicas das endotelinas no trato respiratório	18
1.4. Manejo farmacoterapêutico na SARA	21
1.5. O modelo de lesão pulmonar induzido por ácido olêico	24
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Animais	30
3.2. Extravasamento vascular pulmonar induzido por AO	30
3.2.1. Procedimentos gerais	30
3.2.2. Protocolos experimentais	31
3.2.2.1 Avaliação quantitativa e temporal do extravasamento pulmonar de AE induzido por AO	31
3.2.2.2. Pré-tratamento com meloxicam ou dexametasona	32
3.2.2.3 Análise da ação da ET-1 e agonistas seletivos ET _B no acúmulo pulmonar de AE	32

3.2.2.4 Ações de antagonistas endotelinérgicos no acúmulo pulmonar de AE, induzido com AO	33
3.3. Influência do AO sobre a celularidade no lavado broncoalveolar (BAL)	33
3.3.1. Procedimentos gerais	33
3.3.2. Protocolos experimentais	34
3.4. Análise da atividade da mieloperoxidase no pulmão de camundongos tratados com AO a 200 mg/kg	34
3.5. Análise histopatológica de amostras de pulmão de camundongos tratados com AO a 200 mg/kg	36
3.5.1. Protocolos experimentais	36
3.6. Procedimentos de coloração	37
3.6.1. Coloração com May-Grünwald-Giemsa	37
3.6.2. Preparação do material histopatológico e procedimentos de coloração com hematoxilina-eosina	38
3.7. Sais, drogas e soluções	38
3.8. Análise estatística	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Extravasamento vascular induzido por ácido olêico	42
4.2. Influência do bloqueio da via da cicloxigenase no aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido olêico	46
4.3. Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos no acúmulo pulmonar de AE em camundongos tratados com AO	48
4.4. Influência de agonistas endotelinérgicos no acúmulo pulmonar de AE	56
4.5. Efeitos do AO sobre a celularidade em amostras de lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos – Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos	58
4.6. Análise da atividade da mieloperoxidase no pulmão de camundongos tratados com AO a 200 mg/kg	62
4.7. Avaliação histopatológica dos pulmões de camundongos pré-	

tratados com antagonistas endotelinérgicos e submetidos ao ácido olêico	63
5. DISCUSSÃO	75
5.1. O modelo de lesão pulmonar induzido por ácido olêico em camundongos	75
5.2. Mediação das endotelinas na lesão pulmonar induzida por ácido olêico em camundongos	82
6. CONCLUSÃO	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8. ANEXOS	
8.1. <u>Artigo publicado</u> Guimarães CL; Da-Silva S; Couture R & Rae GA. Mixed endothelin ET _A and ET _B antagonist bosentan inhibits oleic acid-induced lung plasma extravasation in mouse. <i>J Cardiovas Pharmacol</i> 36 (Suppl. 1): S371-S373, 2001.	
8.2. <u>Artigo publicado</u> Guimarães CL; Trentin PG & Rae GA. Endothelin ET _B receptor-mediated mechanisms involved in oleic acid-induced acute lung injury in mice. <i>Clinical Science</i> 103 (Suppl. 48): 340S-344S, 2002.	

LISTA DE ABREVIações

AE	Azul de Evans
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
AO	Ácido Oléico
BAL	Lavado Broncoalveolar
big-ET	Big-endotelina
COX-2	Cicloxygenase-2
DL₅₀	Dose Letal 50%.
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECE	Enzima Conversora de Endotelina
ET-β	Endotelina beta
ET-1	Endotelina-1
ET-2	Endotelina-2
ET-3	Endotelina-3
ET_A	Receptor ET _A
ET_B	Receptor ET _B
ET_C	Receptor ET _C
ETs	Endotelinas
FiO₂	Fração de Oxigênio Inspirado
IL-1	Interleucina-1
IL-1_α	Interleucina-1-alfa
IL-1_β	Interleucina-1-beta
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IrET-1	Endotelina-1 imunorreativa
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo Bacteriano
LTC₄	Leucotrieno-C ₄

MPO	Mieloperoxidase
NEP	Neuropeptidase Neutra
NO	Óxido Nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
PAF	Fator Ativador de Plaqueta
P_{CO2}	Pressão de gás carbônico
PEEP	Pressão Expiratória Final Positiva
PGD₂	Prostaglandina-D ₂
PGE₂	Prostaglandina-E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina-F _{2α}
PGI₂	Prostaciclina ou Prostaglandina-I ₂
P_{O2}	Pressão Arterial de Oxigênio
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SP	Substância P
SX6a	Sarafotoxina-6a
SX6b	Sarafotoxina-6b
SX6c	Sarafotoxina-6c
SX6d	Sarafotoxina-6d
TNF_α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TxA₂	Tromboxano-A ₂
VIC	Peptídeo Intestinal Vasoconstritor
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo

LISTA DE FIGURAS

Figura	Conteúdo	Página
01	Diagrama ilustrativo comparando o alvéolo brônquico normal com o lesionado na fase aguda da SARA.	6
02	Diagrama ilustrativo da síntese de ET-1	9
03	Acúmulo pulmonar de AE e aumento do peso seco de pulmões retirados de camundongos, 1 h após a administração intravenosa de ácido olêico (25, 50, 100 ou 200 mg/kg, i.v.).	41
04	Acúmulo de AE no pulmão, rins e intestino delgado de camundongos (30 – 35 g) tratados com AO (100 mg/kg i.v.) ou veículo (BSA 0,1 %).	42
05	Decurso temporal do acúmulo pulmonar de AE, massa pulmonar seca e, relação peso seco/peso úmido de pulmões de camundongos submetidos à administração intravenosa de 100 mg/kg de AO ou veículo (BSA 0,1 %).	44
06	Decurso temporal do acúmulo de AE e relação peso úmido e seco de pulmões de camundongos submetidos à administração prévia de AO (100 mg/kg; i.v.) ou veículo (BSA 0,1 %). O corante foi administrado 10 min antes do sacrifício dos animais.	45
07	Influência do pré-tratamento com meloxicam (1 ou 5 mg/kg; i.p.) no acúmulo de AE em pulmão de camundongos tratados com AO (100 mg/kg, i.v.).	47
08	Influência do pré-tratamento com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) no acúmulo de AE em pulmão de camundongos tratados com AO (100 mg/kg, i.v.).	48
09	Influência do antagonista misto de receptores ET _A /ET _B , bosentan (15 ou 30 mg/kg, i.v.), no acúmulo de AE em pulmão de camundongos tratados com AO (100 mg/kg, i.v.).	50
10	Influência do ABT-627 (3, 5 ou 10 mg/kg; i.v.) ou A-127722.5 (5 ou 10 mg/kg; i.v.), antagonistas seletivos ET _A , no acúmulo pulmonar de AE em camundongos tratados com AO (100 mg/kg,	

	i.v.).	51
11	Influência do Ro-468443 (3 ou 10 mg/kg; i.v.) ou A-192621 (10, 15 ou 30 mg/kg; i.v.), antagonistas seletivos de receptores ET _B , no acúmulo de AE em pulmões de camundongos tratados com AO (100 mg/kg, i.v.).	53
12	Ações da administração intravenosa (0,3, 1 ou 3 nmol/kg) de ET-1 ou dos agonistas seletivos ET _B , SX6c, BQ-3020, IRL-1620 no acúmulo pulmonar de AE em camundongos.	55
13	Decurso temporal do aumento de celularidade presente em amostras do BAL de camundongos tratados com AO (100 mg/kg, i.v.).	58
14	Influência do bosentan (30 mg/kg, i.v.), antagonista misto de receptores ET _A /ET _B , Ro-468443 (10 mg/kg, i.v.), antagonista seletivo de receptores ET _B e ABT-627 (5 mg/kg, i.v.), antagonista seletivo de receptores ET _A , na celularidade total e específica (leucócitos mononucleares e polimorfonucleares) em amostras de BAL de camundongos tratados com AO (200 mg/kg, i.v.).	59
15	Análise histopatológica de cortes de pulmão de camundongos, submetidos à lesão pulmonar com 200 mg/kg de AO ou tratados com o veículo BSA (0,1% kg ⁻¹).	62
16	Cortes histopatológicos de pulmão, destacando o INFILTRADO INFLAMATÓRIO, de camundongos submetidos ao tratamento com 200 mg/kg de ácido olêico (AO). Coloração com hematoxilina-eosina.	63
17	Cortes histopatológicos de pulmão, destacando a HEMORRAGIA PULMONAR, de camundongos submetidos ao tratamento com 200 mg/kg de ácido olêico (AO). Coloração com hematoxilina-eosina	64
18	Cortes histopatológicos de pulmão, destacando a CONGESTÃO VASCULAR, de camundongos submetidos ao tratamento com 200 mg/kg de ácido olêico (AO). Coloração com hematoxilina-eosina.	65

19	Cortes histopatológicos de pulmão, destacando o EDEMA INTERSTICIAL, de camundongos submetidos ao tratamento com 200 mg/kg de ácido olêico (AO). Coloração com hematoxilina-eosina.	66
20	Análise histopatológica (INFILTRADO INFLAMATÓRIO) de cortes de pulmão de camundongos tratados com bosentan (30 mg/kg), antagonista misto ET _A /ET _B ; Ro-468443 (10 mg/kg) ou A-192621 (30 mg/kg), antagonistas seletivos ET _B ; ou, ABT-627 (5mg/kg) ou A-127722.5 (10 mg/kg), antagonistas seletivos ET _A , i.v., 30 min antes da administração de AO (200 mg/kg).	68
21	Análise histopatológica (HEMORRAGIA) de cortes de pulmão de camundongos tratados com bosentan (30 mg/kg), antagonista misto ET _A /ET _B ; Ro-468443 (10 mg/kg) ou A-192621 (30 mg/kg), antagonistas seletivos ET _B ; ou, ABT-627 (5mg/kg) ou A-127722.5 (10 mg/kg), antagonistas seletivos ET _A , i.v., 30 min antes da administração de AO (200 mg/kg).	69
22	Análise histopatológica (CONGESTÃO VASCULAR) de cortes de pulmão de camundongos tratados com bosentan (30 mg/kg), antagonista misto ET _A /ET _B ; Ro-468443 (10 mg/kg) ou A-192621 (30 mg/kg), antagonistas seletivos ET _B ; ou, ABT-627 (5mg/kg) ou A-127722.5 (10 mg/kg), antagonistas seletivos ET _A , i.v., 30 min antes da administração de AO (200 mg/kg).	71
23	Análise histopatológica (EDEMA INTERSTICIAL) de cortes de pulmão de camundongos tratados com bosentan (30 mg/kg), antagonista misto ET _A /ET _B ; Ro-468443 (10 mg/kg) ou A-192621 (30 mg/kg), antagonistas seletivos ET _B ; ou, ABT-627 (5mg/kg) ou A-127722.5 (10 mg/kg), antagonistas seletivos ET _A , i.v., 30 min antes da administração de AO (200 mg/kg).	72
24	Diagrama ilustrativo da mediação endotelinérgica na SARA experimental induzida por ácido olêico em camundongos.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela	Conteúdo	Página
01	Sumário das desordens clínicas e condições diretas e indiretas associadas com o desenvolvimento da SARA.	4
02	Sumário de alguns antagonistas de receptores ET _A e/ou ET _B .	10
03	Estruturas químicas dos antagonistas endotelinérgicos utilizados no presente trabalho.	37
04	Procedimentos de diluição de drogas e outras substâncias utilizadas no presente trabalho.	38

RESUMO

A Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) é uma insuficiência pulmonar, não-cardiogênica, caracterizada por hipóxia refratária, complacência pulmonar diminuída e ocorrência de infiltrados alveolares difusos. Patologicamente, a SARA apresenta inflamação e elevação da permeabilidade vascular pulmonar, resultado da lesão do epitélio e endotélio pulmonares. A endotelina-1 (ET-1) foi encontrada em níveis elevados no lavado broncoalveolar (BAL) e plasma de ratos, submetidos à lesão pulmonar com ácido olêico (AO), um modelo experimental de SARA ou, no plasma de humanos acometidos de sepse ou SARA. O objetivo do presente estudo foi avaliar, através do emprego de antagonistas de receptores ET_A e ET_B para ETs, a participação destes peptídeos na mediação da lesão pulmonar induzida por AO em camundongos, avaliando-se os níveis de permeabilidade vascular, celularidade leucocitária e parâmetros histopatológicos. Camundongos receberam 50 mg/kg de azul de Evans (AE, i.v.) e 1 h após, AO (25 - 200 mg/kg em BSA 0,1 %, i.v.) e sacrificados em diversos tempos. Os pulmões foram removidos e processados para detecção do teor de AE tecidual por espectrofotometria, como índice da permeabilidade do leito vascular pulmonar. Outros grupos de animais, que não receberam AE, foram tratados com AO (100 ou 200 mg/kg, i.v.), e o BAL coletado 4 h após, para contagem total e específica de leucócitos. Amostras de pulmão de camundongos tratados com AO (200 mg/kg) foram analisados para a atividade da mieloperoxidase (MPO), através do método de ELISA. Em outra série, os pulmões de camundongos lesionados com AO (100 ou 200 mg/kg) foram removidos, fixados em formalina e corados com hematoxilina-eosina, para avaliação histopatológica. O AO, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (i.v.), elevou os níveis intrapulmonares de AE em 150, 610 e 680%, e a massa tecidual seca em 21, 34 e 30 %, respectivamente, relativos ao valor controle correspondente. O pré-tratamento com meloxicam (5 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (1 mg/kg, s.c.) reduziu o acúmulo pulmonar de AE em 63 e 76%, respectivamente, em animais que receberam AO (100 mg/kg, i.v.). O pré-tratamento i.v. em animais submetidos à injeção de AO (100 mg/kg, i.v) com bosentan (15 e 30 mg/kg), antagonista misto de receptores ET_A/ET_B, ou Ro-468443 (3 ou 10 mg/kg) ou A-192621 (10, 15 ou 30 mg/kg), antagonistas seletivos de

receptores ET_B, reduziu o acúmulo pulmonar de AE em 28 e 72%, ou 30 e 47, ou 34, 43 e 80%, respectivamente. O pré-tratamento com A-127722.5 ou ABT-627 (ambos nas doses 3 ou 5 mg/kg), antagonistas seletivos de receptores ET_A, não alteraram significativamente os níveis intrapulmonares de AE. A administração i.v. de ET-1 ou de agonistas seletivos ET_B (SX6c, IRL-1620 ou BQ-3020), nas doses de 0,3, 1 ou 3 nmol/kg, não alteraram os níveis intrapulmonares de AE, em animais não submetidos à administração de AO. A administração i.v de AO na dose de 100 mg/kg causou elevação significativa de leucócitos mononucleares no BAL, enquanto que, na dose de 200 mg/kg, elevou tanto os mononucleares quanto os polimorfonucleares. O pré-tratamento com bosentan (30 mg/kg) ou Ro-468443 (10 mg/kg) reduziu significativamente o acúmulo aumentado de polimorfonucleares, mas não de mononucleares induzido por AO (200 mg/kg, i.v) no BAL. Porém, o pré-tratamento com ABT-627 (5 mg/kg) reduziu os níveis de ambos os tipos celulares no BAL. A atividade da MPO em pulmão de camundongos tratados com AO (200 mg/kg) não diferiu do grupo controle. A análise histopatológica (infiltrado leucocitário, hemorragia, congestão vascular e edema intersticial) de pulmões de camundongos, tratados com AO (100 ou 200 mg/kg, i.v.), demonstrou haver lesão tecidual dependente da dose administrada. O infiltrado leucocitário foi inibido após pré-tratamento com bosentan ou antagonistas seletivos de receptores ET_A (ABT-627 ou A-127722.5) ou ET_B (Ro-468443 ou A-192621). A hemorragia pulmonar foi reduzida pelo pré-tratamento com bosentan, A-192621 e A-127722.5; enquanto que a congestão vascular inibida com A-192621 e, o edema intersticial com Ro-468443. Concluimos que o AO causa aumento da permeabilidade vascular e infiltração leucocitária pulmonar em camundongos, por mecanismos que envolvem mediação endotelinérgica. O aumento da permeabilidade vascular depende da formação de produtos da via da cicloxigenase, e ativação de receptores do tipo ET_B (mas não dos ET_A). O acúmulo de polimorfonucleares requer mecanismos celulares que podem ser deflagrados tanto por receptores ET_A quanto de ET_B e, o acúmulo de mononucleares envolve a ativação dos receptores ET_A, mas não dos ET_B.

ABSTRACT

The Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is a non-cardiogenic pulmonary insufficiency characterised by refractory hypoxia, reduced pulmonary complacency and presence of diffuse cellular infiltrations in the alveoli. Pathologically, ARDS displays inflammation and augmentation of pulmonary vascular permeability. High levels of endothelin-1 (ET-1) have been found in plasma and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of rats following oleic acid (OA) administration, an experimental model of ARDS, and in plasma of patients with sepsis or ARDS. The aim of the present study was to evaluate, making use of antagonists of the ET_A and ET_B receptors for ETs, the participation of these peptides in the mediation of pulmonary injury induced by OA in mice, by assessing pulmonary vascular permeability, accumulation of leukocytes in the BAL and several histopathological features. Mice were given 50 mg/kg of Evans blue (EB; i.v.). One hour later, they were injected with OA (25-200 mg/kg, in BSA 0.1%, i.v.) and were killed at several time points thereafter. Lungs were removed and processed for detection of EB content, by spectrophotometry, as an index of pulmonary vascular permeability. Other groups, which did not receive EB, were treated with OA (100 or 200 mg/kg, i.v.), and BAL was collected 4 h later to enable total and specific leukocyte counts. Lung samples of OA-treated (200 mg/kg) or control mice were analysed for intensity of myeloperoxidase (MPO) activity, using ELISA. In another series, OA-injured lungs (100 or 200 mg/kg) were removed, fixed in formalin and dyed in hematoxylin-eosin for histopathological observation. At doses of 50, 100 and 200 mg/kg, OA enhanced pulmonary EB content (i.e. vascular permeability) by 150, 610 and 680%, and lung dry weight by 21, 34 and 30%, respectively, relative to corresponding control values. Pretreatment with meloxicam (5 mg/kg, i.p.) or dexamethasone (1 mg/kg, s.c.) reduced EB accumulation by 63 and 76%, respectively in lungs of OA-treated (100 mg/kg) mice. In OA-treated mice, i.v. pretreatment with bosentan (15 and 30 mg/kg), a mixed ET_A/ET_B receptor antagonist, or with either Ro-468443 (3 or 10 mg/kg) or A-192621 (10, 15 or 30 mg/kg), both selective antagonists of ET_B receptors, reduced pulmonary EB accumulation by 28 and 72%, 30 and 47%, and 34, 43 and 80%, respectively. Similar pretreatment with A-127722.5 or ABT-627 (each at 3 or 5 mg/kg), selective ET_A receptor antagonists,

failed to alter OA-induced increases in lung EB content. Intravenous injections of ET-1, or of selective ET_B receptor agonists sarafotoxin S6c, IRL-1620 or BQ-3020 (0.3, 1 or 3 nmol/kg) did not modify EB accumulation in lungs of control mice. At 100 mg/kg, i.v. OA enhanced the number of mononuclear cells in BAL, whereas at 200 mg/kg, but mononuclear and polymorphonuclear cell counts were increased. Pretreatment with bosentan (30 mg/kg) or with Ro-468443 (10 mg/kg) significantly inhibited OA-induced (200 mg/kg) accumulation of polymorphonuclear, but not mononuclear, cells in BAL. However, similar pretreatment with ABT-627 (5 mg/kg) reduced the counts of both cellular types in BAL of OA-treated mice. MPO activity in lungs of OA-treated mice (200 mg/kg) was not different from that seen in lungs of control animals. Histopathological analysis revealed marked lung injury in lungs of OA-treated mice (100 or 200 mg/kg), characterised by significant and dose-dependent leukocyte infiltration, haemorrhage, vascular congestion and interstitial oedema. Leukocyte infiltration was inhibited by pretreatment with bosentan or selective ET_A (ABT-627 or A-127722.5) or ET_B receptor antagonists (Ro-468443 or A-192621). Pulmonary haemorrhage was reduced by bosentan, A-192621 or A-127722.5, whereas vascular congestion was inhibited by A-192621, and interstitial oedema by Ro-468443 only. We conclude that OA enhances pulmonary vascular permeability and stimulates leukocyte infiltration by activation ET-mediated mechanisms. The enhancement of pulmonary vascular permeability depends on the formation of products of the cyclo-oxygenase pathway and activation of ET_B (but not ET_A) receptor-mediated mechanisms. Polymorphonuclear cell accumulation in BAL requires cellular mechanisms which can be triggered by either ET receptor type, whereas that of mononuclear cells depends significantly on activation of ET_A (but not ET_B) receptors.

A função respiratória adequada é dependente do volume de O_2 inspirado e de CO_2 expirado, fisiologicamente suficientes, para manter a P_{O_2} e a P_{CO_2} no sangue arterial em seus valores normais. Quando ocorrem distúrbios nas trocas de O_2 e CO_2 entre o alvéolo e o sangue venoso dos capilares pulmonares, haverá desequilíbrio entre a P_{O_2}/P_{CO_2} , acarretando queda da P_{O_2} arterial sistêmica, caracterizando-se assim quadro patológico de insuficiência respiratória. A insuficiência respiratória não se define como doença, mas um distúrbio funcional que pode originar-se de diferentes fatores que afetam a fisiologia pulmonar.

Ao contrário de quadros de “depressão respiratória”, onde a troca gasosa falha devido à existência de hipoventilação, na “insuficiência pulmonar” o déficit na troca gasosa deve-se ao comprometimento patofisiológico da interface entre o alvéolo e o capilar alveolar. Entre as mais graves situações patológicas onde há lesão da junção alveolar/capilar, está a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA), também conhecida como Síndrome da Distrição Respiratória do Adulto ou, ainda, Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (**FISHMAN 1992; EVANS & HASLETT, 1996; LESUR et al., 1999**).

1.1. SÍNDROME DA ANGÚSTIA RESPIRATÓRIA AGUDA:

ASHBAUGH e colaboradores (1967) observaram, a partir do estudo clínico com um grupo heterogêneo de doze pacientes, uma síndrome de insuficiência respiratória, não-cardiogênica, caracterizada por hipoxemia refratária, complacência pulmonar diminuída e ocorrência de infiltrados alveolares difusos detectáveis por radiografias de tórax. Os autores deram a esta síndrome o nome de Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto. Por mais de duas décadas várias outras denominações foram usadas para descrever o mesmo quadro, porém pouco foi

acrescido. Em 1988, **MURRAY** e colaboradores propuseram a extensão da definição da SARA, com o intuito de facilitar os estudos científicos e o tratamento da lesão pulmonar aguda. Os autores classificaram a SARA em fases aguda e crônica e, ainda, definiram diferentes graus de lesão pulmonar, baseado na extensão das anormalidades vistas frente às radiografias de tórax, severidade da hipoxemia, complacência pulmonar e na pressão expiratória final positiva (PEEP) verificada quando da ventilação mecânica dos pacientes. Em 1992, o Comitê “Euro-Americano de Consenso sobre SARA” sugeriu que o termo SARA fosse ampliado para *Síndrome da Angustia Respiratória Aguda*, devido à síndrome não ocorrer somente em pacientes adultos, mas também em crianças (**BERNARD et al., 1994**). Além disso, o Comitê definiu a SARA como sendo uma síndrome aguda, severa, de rápida evolução, persistente (dias a semanas), no qual se verifica inflamação e elevação da permeabilidade pulmonar (parede alveolar/capilar), resultado da lesão do epitélio e endotélio pulmonares, estando associada com um ou mais fatores de risco conhecidos. O Comitê sugeriu, ainda, o termo Lesão Pulmonar Aguda (LPA), patologicamente e clinicamente menos severa que a SARA, para descrever as respostas patológicas contínuas à lesão pulmonar parenquimatosa. A diferença crucial entre a SARA e a LPA reside, entre outros fatores, na severidade da hipoxemia. O nível hipoxêmico pode ser analisado através da razão entre a Pressão Arterial de O₂ (PaO₂) e a Fração de O₂ inspirado (FiO₂), na SARA é de ≤ 200 mm Hg, enquanto que na LPA é ≤ 300 mm Hg (**WEINACKER & VASZAR, 2001**).

Os fatores incidentes exatos que induzem à SARA ainda não estão bem esclarecidos. Epidemiologicamente, todavia, conforme dados estatísticos do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, a SARA acomete, anualmente, cerca de 75 em cada 100.000 pessoas (ou seja cerca de 280 mil indivíduos) daquele país

(**WARE & MATTHAY, 2000**). A síndrome acarreta, ainda, de 40 a 60 % de óbitos, mesmo os pacientes sendo assistidos nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Os motivos mais proeminentes dos altos índices de mortalidade são a sepse e a falência múltipla de órgãos, secundários à SARA, embora diversas outras causas diretas e indiretas, possam estar implicadas (**TABELA 1**). No Brasil, levando-se em consideração as condições estruturais dos hospitais e de suas UTI, provavelmente, os níveis de mortalidade sejam ainda mais elevados.

Na patogênese da SARA há o envolvimento direto de mediadores pró-inflamatórios que iniciam e amplificam a resposta inflamatória, principalmente na fase aguda (para revisão ver **LESUR et al., 1999; WARE & MATTHAY, 2000**). Os mediadores pró-inflamatórios são originados após lesão das barreiras existentes entre o endotélio do capilar e epitélio-alveolares ou, ainda, após infiltração de leucócitos para o interstício do parênquima pulmonar ou para o espaço alveolar e, também, através da ativação de macrófagos alveolares residentes (**FIGURA 1**). Entre as diversas respostas fisiopatológicas induzidas pelos mediadores inflamatórios está o aumento do extravasamento vascular, acarretando elevação no conteúdo protéico no espaço alveolar. Devido à lise das hemácias, destruição de neutrófilos, formação de fibrina e membrana hialina, também é elevado o nível de proteínas presentes nos compartimentos extravasculares. Além disso, ocorre alteração da função ou necrose dos pneumócitos do tipo II. Dessa forma, a função do surfactante, sintetizado e secretado por essas células, fica seriamente comprometida, afetando a complacência pulmonar. Destacam-se ainda, como ações mediadas por substâncias pró-inflamatórias a adesão e migração de leucócitos, bem como ativação de macrófagos e de fibroblastos.

TABELA 1- Sumário das desordens clínicas e condições diretas e indiretas associadas com o desenvolvimento da SARA.

Lesão Pulmonar Direta	Lesão Pulmonar Indireta
Causas mais comuns	Causas mais comuns
<ul style="list-style-type: none"> • Infecções: • Pneumonia viral (Influenza A) • Pneumonia bacteriana • Aspiração de líquido: • Suco gástrico, Afogamento, • Hidrocarboneto líquido 	<ul style="list-style-type: none"> • Sepses bacteriana • Trauma (não-torácico) severo com choque e transfusão múltipla.
Causas menos comuns	Causas menos comuns
<ul style="list-style-type: none"> • Hemorragia pulmonar difusa • Contusão pulmonar • Embolias: Gordurosa, Aspiração do líquido amniótico, Aérea venosa. • Lesão por inalação: NO₂, Cl₂, NH₃, O₂, Fosgênio, Cádmio, Dióxido de enxofre, fumaça tóxica. • Edema pulmonar pós reperfusão • Pneumonite por irradiação • Infecções respiratórias causadas por bactérias, vírus e fungos. • Reação de Leucoaglutininas • Intoxicação: Heroína, Paraquat (inalado) • Coagulação intravascular disseminada • Edema pulmonar por altitude elevada ou neurogênico • Tentativa de suicídio (enforcamento) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dose excessiva de drogas: Heroína, Metadona, Barbitúricos, Colchicina, Propoxifeno, Salicilatos, Fenitoína, Lidocaína, Arabinosídeo de citosina, Óleo de colza desnatado, Etclorvinol, Hidroclorotiazida, Nitrofurantoína, Paraldeído • Quimioterapia • Radioterapia de tórax, Irradiação • Meio de contraste para linfangiografia ou radiológicos • Transfusão de produtos sanguíneos • Desvio cardiopulmonar • Alterações metabólicas: Pancreatite aguda, Uremia, Ingestão de Paraquat. • Elevação da pressão intracraniana • Eclampsia • Circulação extracorpórea • Pós-cardioversão • Febre Maculosa das Montanhas • Malária • Leucemia granulocítica • Púrpura trombocitopênica trombótica

Adaptado de WYNGAARDEN *et al.* (1992), FISHMAN (1992), EVANS & HASLETT (1996), LESUR *et al.* (1999) & WARE & MATTHAY (2000).

Entre os principais mediadores presentes no processo inflamatório da fisiopatologia da SARA, encontram-se eicosanóides, PAF, citocinas e outros peptídeos pró-inflamatórios (para revisão ver **HASLETT, 1996; PARSONS, 1996**).

As citocinas estão amplamente implicadas na síndrome, entre elas destacam-se a IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e o TNF- α (para revisão ver **SMITH *et al.*, 1996**). Estes mediadores são sintetizados por macrófagos residentes ativados, neutrófilos, pneumócitos do tipo II, células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos. **MILLER** e colaboradores (**1992**), demonstraram elevadas concentrações de IL-8 em amostras de BAL de pacientes com SARA que vieram a óbito. Resultados semelhantes foram obtidos de pacientes acometidos de SARA, possivelmente causado por sepse (**MILLER *et al.*, 1996**). Em adição, foi demonstrada ainda, a correlação positiva entre os níveis elevados de citocinas e a contagem de neutrófilos no BAL.

Além das citocinas, os eicosanóides, derivados do ácido araquidônico, também foram correlacionados à SARA (**FINK *et al.*, 1990**). Tanto em humanos como em modelos experimentais de SARA, foram encontrados níveis elevados de TXA₂, leucotrienos e prostaglandinas no lavado broncoalveolar (BAL). A ativação da fosfolipase do tipo A₂, além do ácido araquidônico, também induz a síntese de PAF. Estudos experimentais demonstraram que a infusão de PAF acarreta hipertensão pulmonar e, além disso, foi demonstrado que a infusão de LPS induz elevação dos níveis pulmonares de PAF (**CHANG *et al.*, 1987**).

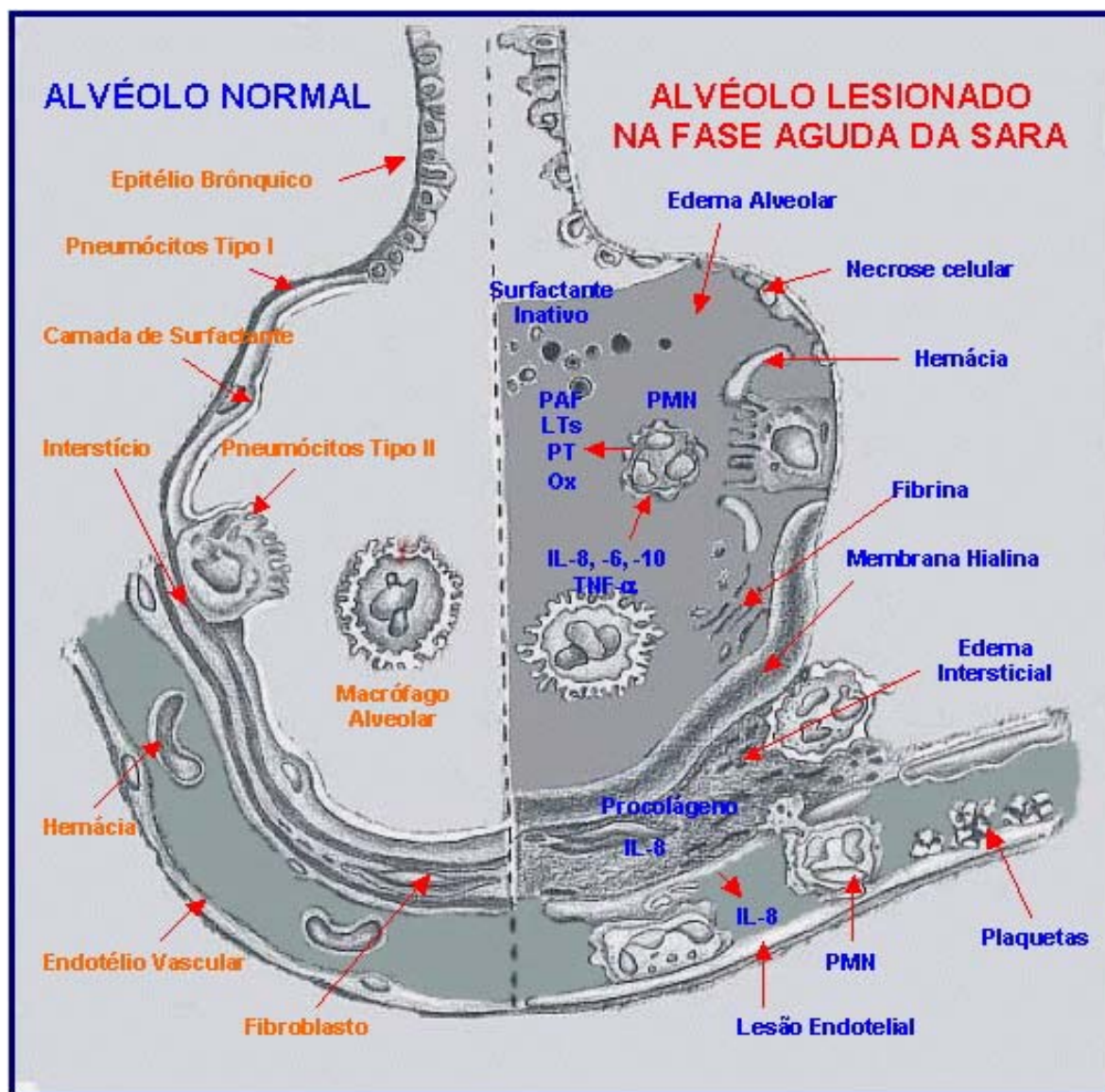


FIGURA 1 - Diagrama ilustrativo comparando o alvéolo pulmonar normal e lesionado na fase aguda da SARA. Nesta fase, há proeminente formação de edema alveolar, rico em proteínas, fibrina e “debris” celulares; edema intersticial e formação de membrana hialina. Há migração de neutrófilos (**PMN**) dos capilares para o espaço aéreo alveolar e, ativação de macrófagos alveolares residentes. Os PMN secretam PAF, prostaglandinas (**PGs**), leucotrienos (**LTs**), proteinases (**PT**) e produtos oxidantes (**Ox**). Os macrófagos secretam interleucina-8 (**IL-8**), **IL-6**, **IL-10** e **TNF- α** . Tanto o **TNF- α** como a **IL-1** ativam os PMN. A **IL-8** também é secretada pelos fibroblastos e endotélio vascular lesionado. O surfactante, sintetizado e liberado pelos Pneumócitos do Tipo II é inativado. Necrose celular é observada no epitélio brônquico (Pneumócitos do Tipo I e II) e no endotélio vascular. Nos capilares, ocorre congestão vascular, formação de microtrombos, lesão endotelial, marginação e infiltração de PMN. Adaptado de **WARE & MATTHAY, 2000**.

Em **1992**, **SIMMET** e colaboradores utilizando o clássico modelo experimental de SARA induzida com ácido olêico (**EIERMANN et al., 1983**), demonstraram elevação significativa do peptídeo endotelina-1 (ET-1) no BAL e plasma de ratos. Em humanos, níveis plasmáticos elevados de ET-1 foram encontrados em pacientes com SARA ou sepse (**DRUML et al., 1993**; **LANGLEBEN et al., 1993**). A ET-1 e outros peptídeos correlacionados são sintetizados no trato respiratório, além de outros sistemas fisiológicos e mimetizam diversas ações que podem ter correlação direta com a gênese e fisiopatologia da SARA (ver maiores detalhes abaixo).

1.2. ENDOTELINAS:

As ETs constituem uma família de peptídeos que induzem diversas respostas fisiológicas e fisiopatológicas em diferentes sistemas biológicos (para revisão ver **KEDZIERSKI & YANAGISAWA, 2001**). Em humanos e outros mamíferos, três isoformas de ETs (ET-1, ET-2 e ET-3) foram descritas (**YANAGISAWA et al., 1988**; **INOUE et al., 1989**). Agregam-se à família, as sarafotoxinas (SX6a, SX6b, SX6c, SX6d) e a bibrotoxina, presentes no veneno das serpentes *Atractaspis engaddensis* (**KLOOG et al., 1988**) e *A. bibroni* (**BECKER et al., 1993**), respectivamente; e o VIC, uma variante da ET-2 presente em camundongos e ratos, também chamado de ET- β (**SAIDA et al., 1989**, **BLOCH et al., 1991**). Há ainda a ET-1₍₁₋₃₁₎ e a ET-1₍₁₋₃₂₎, biologicamente tão ativas quanto os demais membros desse grupo de peptídeos (**WYPIJ et al., 1992**; **FERNANDEZ-PATRON et al., 1999**). Estruturalmente, com exceção da ET-1₍₁₋₃₁₎ e da ET-1₍₁₋₃₂₎, cada peptídeo da família possui vinte e um aminoácidos e contém duas pontes unindo dois pares de resíduos de cisteína (Cis¹-Cis¹⁵ e Cis³-Cis¹¹; para revisão ver **SOKOLOVSKY, 1992**).

A exemplo de outros peptídeos, as ETs são sintetizadas a partir de etapas proteolíticas específicas (**FIGURA 2**). Resumidamente, a síntese protéica inicia-se com a formação da pré-pró-endotelina, codificada por gene específico (**INOUE et al., 1989**). Esta proteína (com aproximadamente 210 aminoácidos) é substrato para endopeptidases específicas, possivelmente a furina, sendo clivada entre os resíduos de lisina e arginina, nas posições 53 e 93. O “corte” protéico origina um peptídeo intermediário chamado de big-endotelina, biologicamente inativo como tal. A big-ET-1 e a big-ET-2 possuem 38 aminoácidos e são clivadas entre os aminoácidos Trp²¹-Val²², enquanto que a big-ET-3, com 39 aminoácidos, é clivada entre os sítios Trp²¹-Ile²², por ação de enzimas conversoras de endotelina (ECE, sensíveis ao bloqueio por fosforamidon e, em alguns casos, tiorfano e 1,10-fenantrolina) dando origem à endotelina correspondente (para revisão ver **BATTISTINI et al., 1993**). A ECE, sensível ao fosforamidon, aparenta ser mais seletiva à big-ET-1 do que à big-ET-3. Existem, pelo menos, a ECE-1 e a ECE-2 e, em adição, existem também distintas isoformas de ambas enzimas. Finalmente, endopeptidases neutras (NEP), clivam as ETs em fragmentos peptídicos não ativos (para revisão ver **SCHWEIZER et al., 1997**).

As respostas fisiológicas induzidas pelas ETs são sinalizadas através da ativação de receptores endotelinérgicos específicos (para revisão ver **KEDZIERSKI & YANAGISAWA, 2001**). Existem, pelo menos, dois tipos de receptores bem caracterizados em mamíferos, os do tipo ET_A e ET_B. Estudos farmacológicos apontam para a existência de um terceiro tipo de receptor, o ET_C encontrado em anfíbios, e também de subtipos de receptores ET_A (ET_{A1} e ET_{A2}) e ET_B (ET_{B1} e ET_{B2}), conhecidos como receptores atípicos.

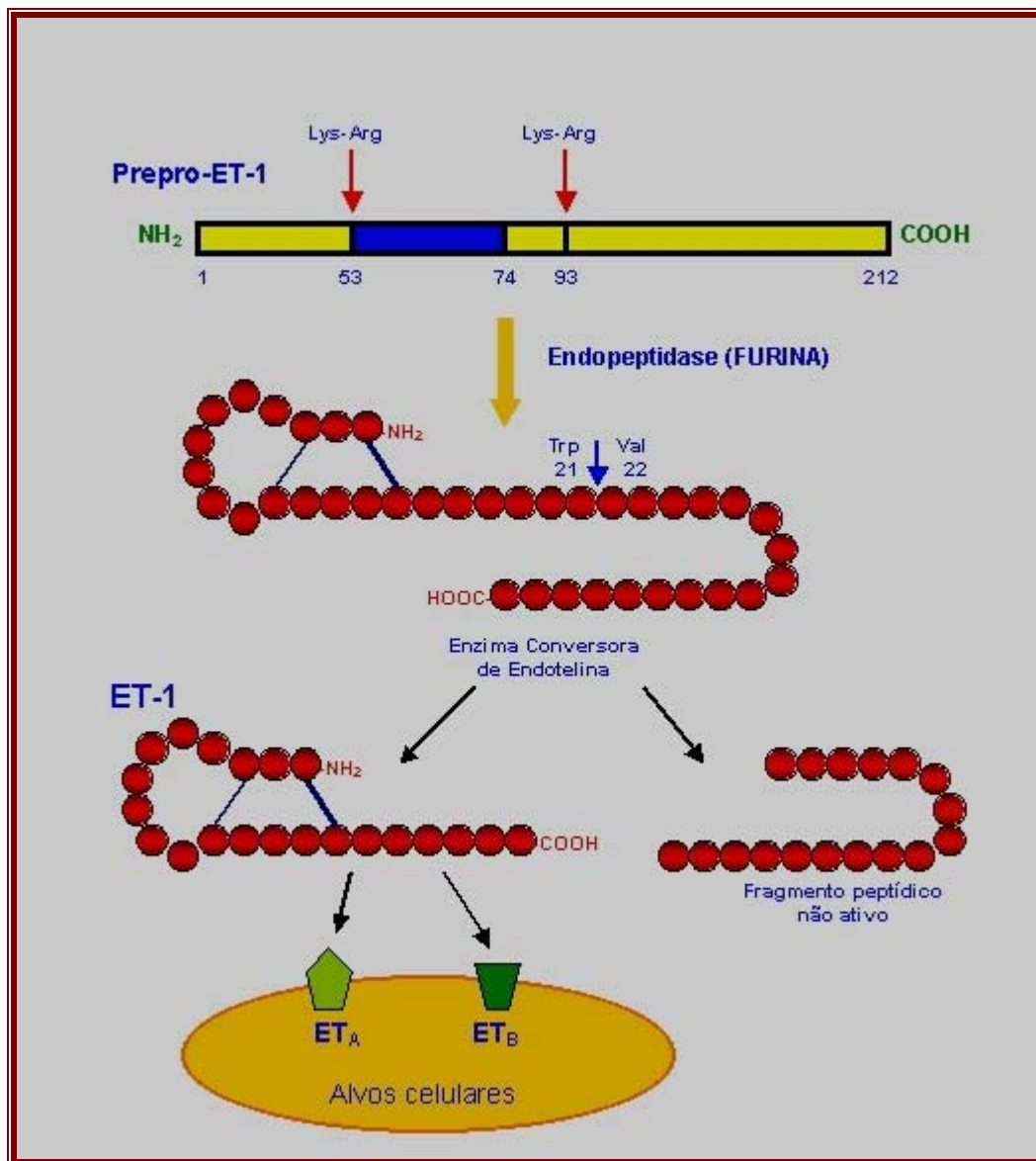


FIGURA 2 – Diagrama ilustrativo da síntese de ET-1. A partir da formação da pré-pró-ET-1, a clivagem protéica por endopeptidases origina a Big-ET-1, convertida em ET-1 pela enzima convertidora de endotelina. As ETs atuam em receptores do tipo ET_A e/ou ET_B.

Os receptores endotelinérgicos pertencem à superfamília de receptores metabotrópicos que contém sete domínios transmembrana e se acoplam às proteínas G, ativando múltiplas vias intracelulares de transdução de sinal, incluindo-se as fosfolipases, a adenilato ciclase, a bomba antiporte Na⁺/H⁺, entre outras. Estes processos celulares resultam na elevação intracelular de inositol-1,4,5-trifosfato, 1,2-diacilglicerol e/ou AMPc, liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares e ativação de proteínas quinases (para revisão ver **RAE et al., 1995**).

Os receptores do tipo ET_A possuem maior afinidade à ET-1 e ET-2 do que à ET-3. Embora, não existam até o presente momento agonistas seletivos para esse tipo de receptor, já foram sintetizados diversos antagonistas seletivos como o BQ-123, o A-127722.5, o FR 139317 e o SB 234551, entre outros (vide **TABELA 2**).

TABELA 2- Sumário de alguns antagonistas de receptores ET_A e/ou ET_B. As drogas apresentadas em negrito, foram utilizadas no presente estudo e os compostos em itálico são de natureza peptídica.

Seletivos ET_A	Seletivos ET_B	Mistos ET_A/ET_B
¹ A-127722.1	¹ A-192621	¹ A-182086.1
¹ ABT-627	² BQ-788	³ Bosentan
² <i>BQ-123</i>	⁴ <i>IRL 2500</i>	² <i>BQ-238</i>
² <i>BQ-610</i>	⁴ <i>IRL 2659</i>	⁶ PD 14893
⁵ <i>FR 139317</i>	⁴ <i>IRL 2796</i>	⁶ <i>PD 143296</i>
² J-105859	⁶ <i>PD 147452</i>	⁸ SB 209670
⁷ LU 135252	⁹ RES-701-1	⁸ SB 217242
⁶ <i>PD 155080</i>	³ Ro 46-8443	⁷ Tezosentan

Patente Farmacêutica: 1-Abbott Labs.; 2-Banyu Pharmaceutical Co. Ltda.; 3-Actelion Ltd.; 4-Novartis; 5-Fujisawa Pharmaceutical; 6-Parke-Davis Pharma Research; 7-Knoll AG; 8-SmithKline Beecham; 9-Tokyo Research Labs.

Os receptores ET_B apresentam afinidade semelhante para as três isoformas peptídicas. Entre os agonistas seletivos para esse receptor, destacam-se a SX6c, o IRL-1620 e o BQ-3020. Entre os antagonistas seletivos, existem o Ro 46-8443, o IRL-2500, BQ-788 e o A-192621. Há ainda, os antagonistas mistos (ou dualistas) ET_A/ET_B como o bosentan, o L751281 e o SB-217242 (para revisão ver **BATTISTINI & DUSSAULT, 1998; GOLDIE, 1998**). Desde a descoberta das endotelinas, diversas empresas farmacêuticas desenvolveram diferentes antagonistas endotelinérgicos; entre esses, vários são estruturalmente não-peptídicos e apresentam boa disponibilidade por via oral, como o bosentan e o tezosentan (**CLOZEL & ROUX, 2000**).

1.3. ENDOTELINAS NO TRATO RESPIRATÓRIO:

No mesmo ano que foi descoberta a ET-1, **UCHIDA** e colaboradores (**1988**) relataram que o peptídeo era um potente broncoconstritor. Rapidamente depois da descoberta das ETs, o número de estudos científicos na área multiplicou-se de forma extraordinária e, em apenas 13 anos, foi aprovado pela agência americana “Food Drug Administration” um antagonista endotelinérgico, o bosentan (*Tracleer*[®], Actelion Ltd), para o controle da hipertensão pulmonar em humanos (**CLOZEL & ROUX, 2000**).

1.3.1. Metabolismo, distribuição e receptores das endotelinas no trato respiratório:

A exemplo do endotélio vascular, diversos outros tipos celulares possuem a capacidade de sintetizar e secretar ETs. No trato respiratório em particular, diferentes populações de células são potencialmente produtoras de ETs, no entanto,

as células endoteliais pulmonares ocupam grande extensão, quando comparadas a outros tipos celulares.

A existência do RNAm como também das isoformas de ECEs no sistema respiratório, sinalizam a capacidade de síntese de ETs ao longo do trato respiratório. O RNAm para a ECE-1a, detectado por hibridização *in situ* ou por imunohistoquímica, foi encontrado em quantidades significativas no pulmão de humano e rato e na mucosa nasal de humano (**FURUKAWA et al., 1996; SALEH et al., 1997**). Quando comparada às concentrações tissulares de humano, as três isoformas de ECE-1 estão em maior proporção no pulmão (**SCHWEIZER et al., 1997**). Estudos com imunofluorescência, através da técnica de “análise de Western Blot”, detectaram somente a expressão de ECE-1a em células endoteliais vasculares de pulmão de rato (**BROWN et al., 1998**). Ao nível celular, a ECE-1a foi co-localizada com a big-ET-1 e ET-1 junto às células epiteliais, células endoteliais, glândulas submucosas e células musculares lisas do trato respiratório de indivíduos saudáveis (para revisão ver **BATTISTINI & DUSSAULT, 1998**).

A provável transcrição protéica para os peptídeos precursores para as ETs, de forma especial para a ET-1, no pulmão de diversas espécies animais, foi avaliada através da detecção do RNAm para a ET-1 por meio da análise da hibridização *in situ* ou pela técnica de “Northern Blot” (para revisão ver **BATTISTINI & DUSSAULT, 1998**). No pulmão de rato, o RNAm para a ET-1 está associado às células epiteliais dos bronquíolos e nos vasos sanguíneos (**MACCUMBER et al., 1989**) e, em humano, encontra-se presente nas células endoteliais pulmonares, vasos sanguíneos alveolares e brônquicos (**GIAID et al., 1993a, b, c**). Em adição, os RNAs mensageiros tanto para a ET-1 como também para a ET-3 são expressos nos macrófagos pulmonares de humano (**EHREINREICH et al., 1990**). Ambas as

isoformas de ETs, ET-1 e ET-3, são abundantemente expressadas no pulmão fetal de rato (**MAcCUMBER et al., 1989**) e humano (**BLOCH et al., 1989**). Similarmente, ETs imunoreativas estão presentes no pulmão adulto de porco (**KITAMURA et al., 1989; HEMSEN et al., 1991**), rato (**KITAMURA et al., 1990a**), cobaia (**FRANCO-CERECEDA et al., 1990**), camundongo (**ROZENGURT et al., 1990**) e humano (**HEMSEN et al., 1990**) e, a big-ET₁₋₃₉ no pulmão de porco (**KITAMURA et al., 1990b**).

Diferentes substâncias bioativas são capazes de induzir a síntese e a secreção de ETs de diferentes células do sistema respiratório, incluindo-se, também, as células endoteliais (**SALEH et al., 1997; NAKANO et al., 1994**). A indução da síntese nas células endoteliais é estimulada pela trombina (**SCHINI, et al., 1989**), adrenalina, ionóforo de Ca²⁺ A-23187 (**YANAGISAWA et al., 1988**), 12-tetradecanoilforbol-13-acetato (**INOUE et al., 1989**), fator de crescimento tumoral- β (**KURIHARA et al., 1989**), IL-1 (**CASEY et al., 1991**), IL-2 (**MIYAMORI et al., 1991**), interferon- γ (**KANSE et al., 1991**), LPS (**SUGIURA et al., 1989**), arginina-vasopressina (**BAKRIS et al., 1991**) e oxi-hemoglobina (**COCKS et al., 1991**). Por outro lado, a síntese de ET-1 por células epiteliais de traquéia de cobaia em cultura é aumentada por endotoxina bacteriana, TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8 (**NINOMIYA et al., 1991; ENDO et al., 1992; SALEH et al., 1997; NAKANO et al., 1994**) e por trombina em coelho (**RENNICK et al., 1993**).

A distribuição ou proporção relativa de receptores endotelinérgicos ET_A e ET_B na musculatura lisa brônquica e traqueal, epitélio brônquico, alvéolos, parênquima pulmonar e pelos vasos sangüíneos que irrigam o trato respiratório parece ser bastante heterogênea. No trato respiratório de camundongo, cobaia e humano, há

maior prevalência dos receptores do tipo ET_B sobre os ET_A. Já os receptores ET_A encontram-se em maior proporção na musculatura lisa traqueal e no alvéolo de ovelha, músculo liso brônquico de porco e, alvéolo de cobaia. Estudos com vasos sangüíneos pulmonares apontam para a prevalência dos receptores ET_A ou ET_B na artéria pulmonar de humano e de coelho, respectivamente (para revisão ver: **FILEP, 1993; RAE et al., 1995; BATTISTINI & DUSSAULT, 1998; BOSCOE et al., 2000**).

O leito vascular pulmonar desempenha importante papel depurativo sangüíneo e catabólico, removendo e degradando a maior parte das ETs circulantes, logo em sua primeira passagem pelo pulmão. Diversos estudos experimentais, com diferentes espécies animais, demonstraram que as ETs sofrem depuração sangüínea de 30 a 60 % ao nível pulmonar (para revisão ver **BATTISTINI & DUSSAULT, 1998**). Além disso, há fortes evidências sugerindo que a remoção das ETs circulantes, pelo leito vascular pulmonar, depende principalmente da sua associação aos receptores endotelinérgicos do tipo ET_B (**FUKURODA et al., 1994b, DUPUIS et al., 1996**).

1.3.2. Efeitos farmacológicos das endotelinas no trato respiratório:

Uma vez sintetizadas, as ETs parecem desempenhar funções autócrinas e/ou parácrinas e medeiam diversas ações como mitogênese, constrição ou relaxamento da musculatura lisa traqueal, brônquica e vascular e induzem a formação e liberação de diversas outras substâncias potencialmente bioativas. Numerosos estudos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado as potentes ações das ETs no trato respiratório. As diferentes atividades exercidas por esses peptídeos podem ocorrer diretamente, através da ativação dos receptores ET_A e/ou ET_B e posterior ativação de mecanismos intracelulares de transdução de sinal, ou indiretamente,

através da indução da síntese e/ou secreção de outras substâncias bioativas (para revisão ver **FILEP, 1993; RAE et al., 1995; BATTISTINI & DUSSAULT, 1998; BOSCOE et al., 2000**).

Em preparações isoladas, as ETs exercem potente atividade constritora da musculatura lisa traqueal e brônquica de cobaia, furão, rato, coelho e humano. As respostas contráteis desenvolvem-se lentamente e prolongam-se por um extenso período de tempo. Em bases molares, a ET-1 é o mais potente broncoconstritor, quando comparada à histamina, à neurocinina A ou aos leucotrienos (**UCHIDA et al., 1988; LEE et al., 1990**). Quando administrada intravenosamente, as ETs, a big-ET-1 ou a SX6b evocam potente efeito broncoconstritor dose-dependente, acompanhado do aumento da pressão arterial média em cobaia (**PONS et al., 1991; PAYNE & WHITTLE, 1988**) e gatos (**DYSON & KADOWITZ, 1991; MINKES et al., 1990**). Porém, quando a ET-1 é administrada na forma de aerossol não se observam mudanças na pressão arterial. A resposta broncoconstritora, *in vivo*, mediada pela ET-1 é máxima em 1 a 2 minutos e observa-se forte taquifilaxia das respostas pressórica e broncoconstritora quando da administração de doses intravenosas repetidas (**PONS et al., 1991**).

A resposta contrátil da musculatura lisa traqueal ou brônquica induzida pelas ETs é mediada, em parte, através da liberação e ação de outras substâncias (para revisão ver: **FILEP, 1993; RAE et al., 1995; RAE & HENRIQUES, 1998**). Há evidências substanciais que apontam o envolvimento de derivados eicosanóides nas respostas contráteis eliciadas pelas ETs no trato respiratório. A ET-1 induz a liberação de TXA₂ em pulmão isolado e perfundido de rato e cobaia, e traquéia, brônquio e parênquima de cobaia e brônquio humano (**De NUCCI et al., 1988; FILEP et al., 1990; PONS et al., 1991; D'ORLEANS-JUSTE et al., 1991; WHITE**

et al., 1992). Além do TXA₂, a ET-1 é capaz de induzir a formação de outros derivados eicosanóides (PGI₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGE₂, LTC₄) de diferentes tipos celulares do trato respiratório (**WU et al., 1993; D'ORLEANS-JUSTE et al., 1992; HAY et al., 1993; NINOMIYA et al., 1992; YAMAMURA et al., 1994; EGGER et al., 1995**), bem como liberar mediadores não-eicosanóicos como a histamina (**UCHIDA et al., 1992; EGGER et al., 1995**) e 5-HT de mastócitos pulmonares ativados (**EGGER et al., 1995**). Na presença de bloqueadores da cicloxigenase (**PAYNE et al., 1988; MAcQUIN-MAVIER et al., 1989; PONS et al., 1991**), como a indometacina, ou por antagonistas de receptores para leucotrienos como o YM 16638 e o FPL 55712 (**FILEP et al., 1991**), as respostas contráteis induzidas pela ET-1 são reduzidas em preparações isoladas de traquéia e brônquio. Em adição, o pré-tratamento com indometacina diminui a broncoconstrição *in vivo* induzida por ET-1 em cobaia e gato (**PONS et al., 1991; DYSON et al., 1991**). Por outro lado, há diversos estudos questionando a mediação dos produtos da via da cicloxigenase nas ações constritoras mediadas pelas ETs no trato respiratório.

Além da atividade constritora no sistema respiratório, as ETs também podem mediar ações relaxantes da musculatura lisa, particularmente em preparações que apresentam elevado tono basal. Vários estudos apontam para a mediação indireta da PGI₂ ou do NO na mediação do relaxamento das vias aéreas isoladas induzidas pela ET-1 (para revisão ver **BOSCOE et al., 2000**). Em preparações de traquéia de cobaia, *in situ*, a ET-1, administrada intravenosamente, causa resposta bifásica, caracterizada por relaxamento transiente seguida por contração sustentada. Além disso, o tratamento com indometacina foi capaz de reduzir a atividade constritora (**WHITE et al., 1991**). Em tiras isoladas de traquéia de cobaia, pré-contraídas com acetilcolina ou submetidas ao choque anafilático, *in vitro*, com ovalbumina, a adição

de ET-1 é capaz de induzir resposta relaxante (**GRUNSTEIN et al., 1991; SAOTOME et al., 1991**).

O leito vascular do sistema respiratório é extremamente sensível às ações mediadas pelas ETs. Dependendo do tônus vasomotor, as ETs podem induzir vasoconstrição ou relaxamento (para revisões ver: **BARNES & LIU, 1995; BOSCOE et al., 2000, MACLEAN, 1998; BATTISTINI & DUSSAULT, 1998**). As ETs induzem contração de anéis isolados de vasos pulmonares de ovelha (**TOGA et al., 1992a**), cobaia (**HAY et al., 1993**) e humano (**McKAY et al., 1991; HAY et al., 1993**). No leito vascular pulmonar perfundido, com tônus sub-basal, tanto a ET-1 como a ET-3 elevam a pressão pulmonar arterial e/ou a resistência vascular pulmonar em diferentes espécies animais (**TOGA et al., 1991; MANN et al., 1991; HORGAN et al., 1991; CRAWLEY et al., 1992a**). Por outro lado, quando o tônus vascular está elevado, naturalmente ou artificialmente, as ETs induzem respostas vasodilatadoras dose-dependentes (**PERREAULT & De MARTE, 1991; WONG et al., 1993; HASUNUMA et al., 1990; TOGA et al., 1991; LIPPTON et al., 1991; CRAWLEY et al., 1992b**). Os receptores ET_A participam na mediação de respostas predominantemente vasoconstritoras, especialmente em vasos pulmonares de condutância (**MACLEAN, et al., 1994**). Por outro lado, os receptores ET_B geralmente medeiam respostas vasodilatadoras e estão densamente localizados nos vasos de resistência. Em adição, a resposta vasodilatadora via ativação dos receptores ET_B é devida, em parte, pela formação de óxido nítrico e PGI₂ (para revisão ver: **MACLEAN, 1998; BATTISTINI & DUSSAULT, 1998**). Porém, há discrepâncias importantes quanto a este aspecto, entre as quais a artéria pulmonar isolada de coelho, onde receptores ET_B medeiam vasoconstrição ao invés de vasodilatação (**KLEHA et al., 1994**).

1.3.3. Implicações fisiopatológicas das endotelinas no trato respiratório:

No trato respiratório, as ETs medeiam direta ou indiretamente a fisiopatologia de várias doenças, crônicas ou agudas (para revisão ver: **KEDZIERSKI & YANAGISAWA, 2001; GOLDIE & FERNANDES, 2000; BOSCOE *et al.*, 2000**). As concentrações das ETs em macerado tecidual, em amostras séricas ou plasmáticas ou, ainda, no lavado broncoalveolar (BAL) estão elevadas em distintas patologias em humanos ou determinada por intermédio de modelos experimentais (para revisão ver **BATTISTINI *et al.*, 1993**).

Logo após a descoberta das ETs, ocorreram sugestões implicando-as como possíveis mediadores da **asma brônquica**, tendo-se por base a potente atividade espasmogênica na musculatura lisa das vias aéreas humana e animal (vide tópico anterior). Além disso, os níveis de ET-1 estão significativamente elevados no tecido brônquico, BAL e no sangue de pacientes acometidos de asma (**MATTOLI *et al.*, 1991; SPRINGALL *et al.*, 1991; SOFIA *et al.*, 1993; AOKI *et al.*, 1994; REDINGTON *et al.*, 1995**). As ETs mimetizam vários sintomas co-relacionados à asma como hipersecreção e diminuição da depuração de muco, hiperplasia das glândulas mucosas, aumento da sensibilidade da musculatura lisa traqueal e brônquica, fibrose subepitelial e atividade mitogênica (para revisão ver **GOLDIE *et al.*, 1996; MICHAEL *et al.*, 1996**). A ET-1 é um dos mais potentes peptídeos espasmogênicos da musculatura lisa aérea humana e animal, tendo as concentrações efetivas médias abaixo da unidade dos nanomolares (**HENRY *et al.*, 1990; HAY *et al.*, 1993**). Este achado, é compatível com a idéia de que a liberação endógena de ET-1 contribua significativamente com a elevação do tônus brônquico observado na asma. Nesta patologia, a ativação de vias nervosas colinérgicas está diretamente implicada no aumento do tônus muscular liso. A ET-1 potencializa a

resposta contrátil colinérgica da musculatura lisa aérea, induzida por estimulação elétrica, em coelho (McKAY *et al.*, 1993; YONEYAMA *et al.*, 1995), camundongo (HENRY & GOLDIE, 1995; CARR *et al.*, 1996), rato (KNOTT *et al.*, 1996) e humano (FERNANDES *et al.*, 1981; FERNANDES *et al.*, 1996). A ET-1 também possui importante papel mitogênico nas vias aéreas. Esta suposição encontra respaldo nos estudos que evidenciaram que a ET-1 causa proliferação de células musculares lisas de traquéia de cobaia, coelho e ovelha em cultura (STEWART *et al.*, 1994; NOVERAL *et al.*, 1992; GLASSBERG *et al.*, 1994). Além disso, em humanos, a ET-1 é um potente secretagogo na mucosa aérea, o que sugere, também, a mediação endotelinérgica na *rinite alérgica*. A exposição da mucosa nasal humana à ET-1 resulta na secreção de lactoferrina e muco glicoprotéico de ambas células mucosa e serosa (MULLOL *et al.*, 1993). Em adição, em indivíduos saudáveis e alérgicos, a ET-1 eleva a concentração de muco nasal de forma concentração-dependente (RICCIO *et al.*, 1995). No processo fisiopatológico da asma brônquica, o aumento da permeabilidade vascular contribui significativamente para a obstrução das vias aéreas, acarretando diminuição do diâmetro do lúmen e impedindo o fluxo de ar. Neste sentido, as ETs podem estar envolvidas no extravasamento vascular nas vias aéreas. No pulmão isolado e perfundido de rato e cobaia, a ET-1 induz edema e elevação do peso pulmonar, provavelmente devido à elevação da pressão microvascular e um efeito direto na retração das células endoteliais, acarretando no aumento da permeabilidade vascular (HORGAN *et al.*, 1991; FILEP *et al.*, 1993; HELSET *et al.*, 1993). Isto pode ser devido, em parte, a liberação de mediadores secundários como o PAF e TXA₂ (FILEP *et al.*, 1993; FILEP *et al.*, 1990; SIROIS *et al.*, 1992). Além desses mediadores, as ETs estão envolvidas na síntese e liberação

de diversos agentes pró-inflamatórios nas vias aéreas (vide item anterior), que podem estar contribuindo para a fisiopatologia da asma brônquica.

A **alveolite fibrosante criptogênica** e a **fibrose pulmonar idiopática** são patologias pulmonares caracterizadas por fibrose pulmonar periférica acompanhada da proliferação dos pneumócitos do tipo II e fibroblastos. Os níveis tissulares de irET-1 estão significativamente elevados em pneumócitos do tipo II e células epiteliais, obtidas de amostras de pulmão de pacientes acometidos de alveolite fibrosante criptogênica (**GIAID et al., 1993**). Em adição, as ETs parecem desempenhar relevante função como fatores de crescimento, como observado em alguns casos de **tumores pulmonares**. Em amostras de tumores pulmonares (carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma) foram determinados níveis elevados de irET-1 e, por outro lado, a ET-1 é profusamente secretada por células tumorais em cultura (**SHICHIRI et al., 1991; GIAID et al., 1990**).

Além das patologias respiratórias que acarretam aumento na resposta contrátil da musculatura lisa da traquéia, brônquios ou parênquima pulmonar, as ETs estão, também, implicadas nas patologias vasculares, como a **hipertensão pulmonar**. As concentrações de irET-1 em amostras de sangue arterial e venoso de indivíduos sadios estão significativamente menores do que em amostras obtidas de pacientes com hipertensão pulmonar secundária a várias patologias (**LEVY et al., 1990; STEWAER et al., 1991**). Por exemplo, em pacientes com hipertensão pulmonar secundária a distúrbios das válvulas cardíacas, os níveis plasmáticos de irET-1 estão significativamente elevados, retornado ao normal, após cirurgia cardíaca corretiva (**CHANG et al., 1993**). Os níveis elevados de ETs também são possíveis de serem determinados em modelos experimentais de hipertensão pulmonar. Em ratos com hipertensão pulmonar idiopática, ocorre produção elevada

de ET-1 intrapulmonar (**STELZNER et al., 1992**). Por outro lado, no modelo induzido por monocrotalina, evidencia-se elevação da pressão intraarterial pulmonar e hipertrofia ventricular direita. Estes achados estão correlacionados com aumentos do teor plasmático de ET-1, como também na susceptibilidade destes efeitos à inibição por antagonistas de receptores ET_A ou ET_A/ET_B (**MAcLEAN, 1998**).

A elevação do extravasamento vascular pulmonar, acarretando a formação de edema, pode ser devido às lesões pulmonares diretas ou indiretas, causadas por diferentes agentes etiológicos (vide Tabela 1). Entre as doenças do trato respiratório no qual há o possível envolvimento das ETs mediando os processos de permeabilidade vascular, migração de células inflamatórias ou, ainda, na manutenção do processo fisiopatológico encontra-se a **SARA**. Estudos clínicos e experimentais demonstraram que os níveis plasmáticos de ET-1 estão elevados em humanos (**DRUML et al., 1993; LANGLEBEN et al., 1993**) acometidos de SARA ou, em animais submetidos à lesão pulmonar com ácido oléico (**SIMMET et al., 1992**).

1.4. MANEJO FARMACOTERAPÊUTICO NA SARA:

No processo fisiopatológico da SARA, observam-se alterações na permeabilidade vascular pulmonar, infiltração de células inflamatórias, mitogênese, alterações na reatividade da musculatura lisa vascular, brônquica e traqueal, lesão ou necrose celular do endotélio vascular, pneumócitos tipo I e II e, alterações da permeabilidade da barreira capilar-alveolar. A lesão pulmonar aguda acarreta a síntese de diversos mediadores do processo inflamatório que atuarão no endotélio capilar e membrana alveolar induzindo edema e hipertensão pulmonar. As células endoteliais lesionadas diminuem a secreção de óxido nítrico e PGI₂ e, elevam a secreção de ET-1. As ETs podem estar implicadas diretamente nos mecanismos

fisiopatológicos da SARA, devido às suas múltiplas ações no sistema respiratório e por mimetizaram respostas fisiológicas semelhantes às aquelas observadas na síndrome.

A intervenção farmacoterapêutica na SARA objetiva controlar o processo inflamatório e a hipertensão pulmonar, presentes na fase aguda e na fibrose pulmonar, muitas vezes, seqüela tecidual residente na fase crônica que culmina em doença pulmonar obstrutiva crônica. Entre os possíveis agentes farmacológicos, com razoável eficácia clínica, encontram-se os antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais, óxido nítrico, PGI₂ e PGE₁, diuréticos e antibióticos.

A utilização de agentes antiinflamatórios na SARA tem gerado resultados conflitantes (**METZ et al., 1991**). Estudos conduzidos com corticosteróides, potentes agentes antiinflamatórios que inibem indiretamente a síntese de prostanóides devido ao bloqueio da fosfolipase A₂, em modelos animais, mostraram-se eficazes em reduzir a lesão pulmonar aguda, porém em humanos os resultados foram contraditórios. Os antiinflamatórios não-esteroidais seriam úteis na SARA devido ao bloqueio da agregação plaquetária e a inibição da formação de espécies reativas de oxigênio e produtos do lisossoma de neutrófilos. Estudos clínicos em humanos acometidos de SARA, devido a sepse, demonstraram que a indometacina (**STEINBERG et al. 1990**) e/ou ibuprofeno (**BERNARD et al. 1988**) foram eficazes em elevar a troca gasosa pulmonar. Porém o dazoxibeno, bloqueador seletivo da tromboxano A₂-sintetase, não foi eficaz em melhorar a hemodinâmica ou a troca gasosa pulmonar (**LEEMAN et al. 1985**). Em adição, entre as limitações quanto ao uso dos agentes antiinflamatórios não-esteroidais na SARA está a diminuição da filtração glomerular. Talvez, com estudos pré-clínicos e clínicos com os recentes inibidores seletivos da COX-2, amplifique-se o uso dessas drogas na SARA.

Clinicamente promissor está a utilização de vasodilatadores administrados por via inalatória, especificamente o NO e as prostaglandinas vasodilatadoras (PGI₂ e PGE₁). O óxido nítrico inalado eleva significativamente a vasodilatação pulmonar, melhorando a hemodinâmica e a troca gasosa, sem no entanto, afetar a pressão arterial sistêmica (**FROSTELL *et al.*, 1991; FRATACCI *et al.* 1991; FROSTEEL *et al.* 1993**). Entretanto, a ação permeante mediada pelo NO, como também, citotoxicidade, dano na estrutura do DNA e inativação de enzimas mitocondriais, pode limitar o seu uso terapêutico (**ROSSAINT *et al.* 1993**). A utilização de PGI₂ ou PGE₁, administradas em aerossol, mostrou maior eficácia clínica quanto comparada à infusão intravenosa em humanos (**BONE *et al.* 1989; RUSSEL *et al.* 1990; MELOT *et al.*, 1989**). Os prostanóides melhoram a hemodinâmica e a troca gasosa, porém podem amplificar a formação de edema intersticial (**SILVERMAN *et al.*, 1990; BIHARI *et al.* 1987; WALMRATH *et al.*, 1993**).

Em vista do exposto acima, é bastante evidente que o arsenal terapêutico para o tratamento da SARA ainda é bastante limitado. Assim, urge que sejam aprofundados estudos acerca dos mecanismos celulares subjacentes a esta grave fisiopatologia, bem como conduzidas novas pesquisas pré-clínicas e clínicas que explorem novos agentes terapêuticos potencialmente úteis no tratamento da SARA. As ETs são potentes peptídeos que medeiam diversas respostas fisiológicas no trato respiratório como também, estão implicadas em diferentes patologias. Os resultados acumulados até o presente momento apontam a mediação endotelinérgica na permeabilidade pulmonar, migração celular, proliferação e diferenciação celular, indução da síntese e liberação de diferentes mediadores do processo inflamatório. Além disso, esses peptídeos exibem potente atividade vasoconstritora pulmonar e constrição da musculatura lisa traqueal e brônquica, e podem inibir a síntese e

liberação de agentes vasodilatadores, de surfactante dos pneumócitos do tipo II, bem como a secreção de muco, além de outras respostas teciduais. Paralelamente aos estudos fisiológicos, os estudos farmacológicos indicam, ainda, diferenciação na distribuição e densidade dos receptores endotelinérgicos no trato respiratório. A conclusão preliminar quanto ao papel das ETs no trato respiratório indica a participação fundamental dessa classe de peptídeos nos processos homeostáticos e patológicos do trato respiratório.

Os resultados acumulados quanto ao envolvimento das ETs na SARA sugerem que o bloqueio do sistema endotelinérgico possa vir a constituir uma nova intervenção farmacoterapêutica viável para o manejo desta condição. No entanto, estudos pré-clínicos, utilizando modelos de lesão pulmonar aguda e/ou crônica, aliados aos estudos clínicos devem fundamentar o uso racional dos antagonistas endotelinérgicos na síndrome. A literatura acumulada apresenta poucos estudos com modelos animais de lesão pulmonar que apontam o papel das ETs na SARA e, raros, também, são os estudos conduzidos demonstrando a eficácia farmacológica e/ou clínica dos antagonistas endotelinérgicos nesta síndrome.

1.5. O MODELO DE LESÃO PULMONAR INDUZIDO POR ÁCIDO OLÊICO:

Vários modelos animais possibilitam o estudo de diversos parâmetros fisiopatológicos de diferentes doenças que ocorrem no trato respiratório. Entre os modelos experimentais mais utilizados para o estudo experimental da lesão pulmonar aguda, semelhante à SARA, está o que utiliza o ácido olêico (AO) como agente indutor da síndrome (para revisão ver **SCHUSTER, 1994**). Este modelo animal vem permitindo elucidar os diferentes mecanismos fisiopatológicos presentes

na SARA, como também, permitindo avaliar o potencial terapêutico de diversas drogas, úteis no controle clínico da doença.

A indução da lesão pulmonar pode ser realizada utilizando-se meios químicos, físicos ou biológicos. Entre os agentes químicos, destacam-se carragenina (CUZZOCREA *et al.*, 1999), LPS (FRANK & ROBERTS, 1979; MIOTLA *et al.*, 1998a e 1998b; ISKIT & GUC, 2001), zimosan A (MIOTLA *et al.*, 1998b), alfa-naftiltioréia (SIPAHI *et al.*, 1996), acetato de forbol-miristato (WEILAND *et al.*, 1989), sílica (SHI *et al.*, 2001), paraquat (GIRI *et al.*, 1981), H₂O₂ (JACKSON *et al.*, 1985), bicuculina (HERBST *et al.*, 1995) e bleomicina (MUTSAERS *et al.*, 1998). Fisicamente, a lesão pulmonar pode ser induzida após depleção de surfactante pulmonar (LACHMANN *et al.*, 1980; KAISERS *et al.*, 2000), através da lavagem broncoalveolar com salina ou, por embolia aérea, por meio da infusão de ar, diretamente no leito vascular pulmonar (WANG *et al.*, 1992). Além disso, obtém-se lesão pulmonar através da isquemia pulmonar (STAMMBERGER *et al.* 1999; TANAHASHI *et al.*, 1999) ou intestinal (GALILI *et al.*, 1998; MITSUOKA *et al.*, 1999) seguida de reperfusão, *in vivo* ou *in vitro* (KHIMENKO *et al.*, 1996). Os diversos modelos experimentais propostos para o estudo da lesão pulmonar aguda ou crônica permitem inferências no estudo da fisiopatologia da SARA. No entanto, muitos desses modelos não mimetizam por completo as características patológicas observadas na síndrome em humanos.

O AO é um ácido graxo insaturado, contendo 18 carbonos e uma dupla ligação (ácido 9-cis-octadecenóico, C₁₈H₃₄O₂). É utilizado classicamente como agente lesivo pulmonar com o objetivo experimental de mimetizar as características fisiopatológicas observadas na SARA humana (ASHBAUGH & UZAWA, 1968). Estudos experimentais com AO já foram conduzidos em ratos (BALL *et al.*, 1988;

BALL et al., 1989; MORIUCHI et al., 1995), coelhos (**BUTLLER & SPICER, 1986; PANARETTO et al., 1991**), cães (**YAMAGUCHI et al., 1992; MOTOHIRO et al., 1986**), porcos (**BOLLIGER et al., 1991**), ovelhas (**YUKIOKA et al., 1985**), cobaias (**MORIUCHI et al., 1998**) e camundongos (**HAKKINEN et al., 1983; DEJUN et al., 1996**). São muitas as similaridades entre a lesão pulmonar induzida por AO e àquela observada em pacientes acometidos com SARA, principalmente a causada por embolia gordurosa (para revisão ver **SHUSTER, 1994**). Tanto a SARA em humanos como a experimental, induzida por AO, apresenta três fases patofisiológicas distintas: a exsudativa, a proliferativa e a fibrótica (**TOMASHEFSKI, 1990**). Estendendo achados preliminares acerca da toxicidade do AO relatados por **JEFFERSON & NECHELES (1948)**, **ASHBAUGH & UZAWA (1968)** observaram que a administração intravenosa de AO em cães causa, rapidamente, lesões pulmonares semelhantes às observadas nos primeiros estágios da SARA humana. Na fase exsudativa, os pulmões dos animais demonstravam zonas hemorrágicas irregulares, nas quais as arteríolas apresentavam-se oclusas com hemácias, em grande parte hemolisadas. Além disso, havia sinais evidentes de edema intersticial e intraalveolar, trombos, congestão vascular e membrana hialina. Por outro lado, **DERKS & JACOBVITZ-DERKS (1977)** e **MONTANER e colaboradores (1986)** descreveram que a fase proliferativa da lesão induzida por AO compreende a infiltração de células inflamatórias, neutrófilos e macrófagos, ao mesmo tempo em que ocorria a resolução do edema intersticial e intraalveolar e a proliferação dos pneumócitos do tipo II. Já a fase fibrótica caracteriza-se pela proliferação de fibroblastos e o surgimento de fibrose pulmonar (**JOHANSON et al., 1982**).

Uma análise dos trabalhos até aqui realizados utilizando o AO para indução de lesão pulmonar revela diferenças metodológicas importantes que podem alterar

significativamente a extensão das lesões pulmonares, a infiltração leucocitária e o acúmulo de líquido extracelular (para revisão ver, **TOMASHEFSKI, 1990; SCHUSTER, 1994**). Tais variações metodológicas possivelmente são responsáveis pela divergência quantitativa e qualitativa de resultados obtidos por autores distintos. Embora alguns estudos tenham utilizado o AO puro, a maioria dos trabalhos optou por dissolvê-lo em solução contendo albumina sérica bovina, no intuito de diminuir a toxicidade e facilitar a sua dissolução, sendo a via intravenosa a padrão para a administração. Com relação à dose de AO escolhida, verifica-se grande variabilidade intra e interespecies. Neste sentido, as doses variaram de 50 a 150 mg/kg em ratos (**EIERMAN et al., 1983; BALL et al., 1988; BALL et al. 1989; VOLPE et al., 1994; SYRBU et al., 1996**), 100 a 125 mg/kg em coelhos (**SPRAGG et al., 1982; BUTLER et al., 1986; JONES et al., 1982; PANARETTO et al., 1991**), 2 a 80 mg/kg em porcos (**KRUSE-ELLIOTT & OLSON et al., 1990; BOLLINGER et al., 1991**), 75 mg/kg em ovelha (**YUKIOKA et al., 1986**), 15 a 60 mg/kg em cobaia (**MORIUCHI et al., 1995; MORIUCHI et al., 1998**), 40 a 324 mg/kg em cães (**MOTOHIRO et al., 1986; ASHBAUGH & UZAWA, 1968; YAMAGUCHI et al., 1992; DERKS & JACOBVITZ-DERKS, 1977; ASHBAUGH & UZAWA, 1968**) e, em camundongos, a variação foi de 200 (**DEJUN et al., 1996**) a 800 mg/kg (**HAKKINEN et al., 1983**).

As diversas semelhanças entre as lesões tissulares observadas na SARA humana, principalmente nas duas primeiras fases da síndrome e, àquelas induzidas por AO em animais, torna este modelo experimental de lesão pulmonar o mais apropriado para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na síndrome. Neste sentido, no presente trabalho, camundongos foram a espécie animal escolhida para o estudo farmacológico das ETs na lesão pulmonar induzida por AO. Nesta espécie animal, são poucos os estudos experimentais de lesão pulmonar com

AO, como já relatado e, a padronização metodológica experimental encontra diferenças significativas. Além disso, em camundongos, a dose de uma determinada droga, expressa em mg/kg, equivalente a mesma aplicada em ratos, por exemplo, é geralmente dez vezes inferior, o que economiza na quantidade de droga necessária à obtenção de um resultado experimental. Em adição, o manejo de camundongos é economicamente muito mais inferior do que com outras espécies laboratoriais.

O presente trabalho de pesquisa teve por objetivo geral obter subsídios experimentais que permitissem demonstrar o envolvimento das endotelinas endógenas na mediação da lesão pulmonar induzida por ácido olêico em camundongos, um possível modelo experimental de SARA.

2.1. Objetivos específicos:

- *Padronizar o modelo experimental de SARA*, induzido por ácido olêico, em camundongos, enfatizando-se o extravasamento vascular e a migração de células leucocitárias.
- Avaliar a influência da administração de ET-1 e de agonistas seletivos ET_B na permeabilidade vascular pulmonar em camundongos.
- Determinar qual receptor endotelinérgico medeia a permeabilidade pulmonar em camundongos submetidos à SARA com ácido olêico, através de antagonistas de receptores endotelinérgicos ET_A e/ou ET_B.
- Determinar qual receptor endotelinérgico medeia a migração leucocitária pulmonar em camundongos submetidos à SARA com ácido olêico, através de antagonistas endotelinérgicos.
- Investigar a influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos ET_A e/ou ET_B sobre os índices histopatológicos da lesão pulmonar induzida por ácido olêico.

4.1. Extravasamento vascular induzido por ácido oléico:

A administração i.v. de AO, nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg, elevou tanto o acúmulo intrapulmonar de AE como também o peso seco dos pulmões. A **FIGURA 3** ilustra as variações de ambos parâmetros medidos 1 h após injeção de AO. Nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg de AO, o acúmulo intrapulmonar de AE foi elevado significativamente para 2,5, 7,1 e 7,8 vezes, respectivamente, em relação ao acúmulo basal do corante. Nestas mesmas doses, o aumento da massa tecidual pulmonar seca foi de 21, 34 e 30%, respectivamente, em relação ao valor observado em camundongos controle que não receberam AO

Em outros grupos de animais (30 – 35 g) foi comparado o acúmulo de AE (1 h) induzido por 100 mg/kg de AO nos pulmões, rins e intestino delgado. Conforme ilustra a **FIGURA 4**, o AO aumentou significativamente o extravasamento do corante nos pulmões e intestino delgado em 250 e 67% respectivamente, quando comparado aos valores dos órgãos obtidos do grupo controle tratado com 0,1% BSA. Ao contrário do observado nos dois tecidos anteriores, o aumento do teor de AE nos rins de camundongos tratados com AO (40%) não foi significativo.

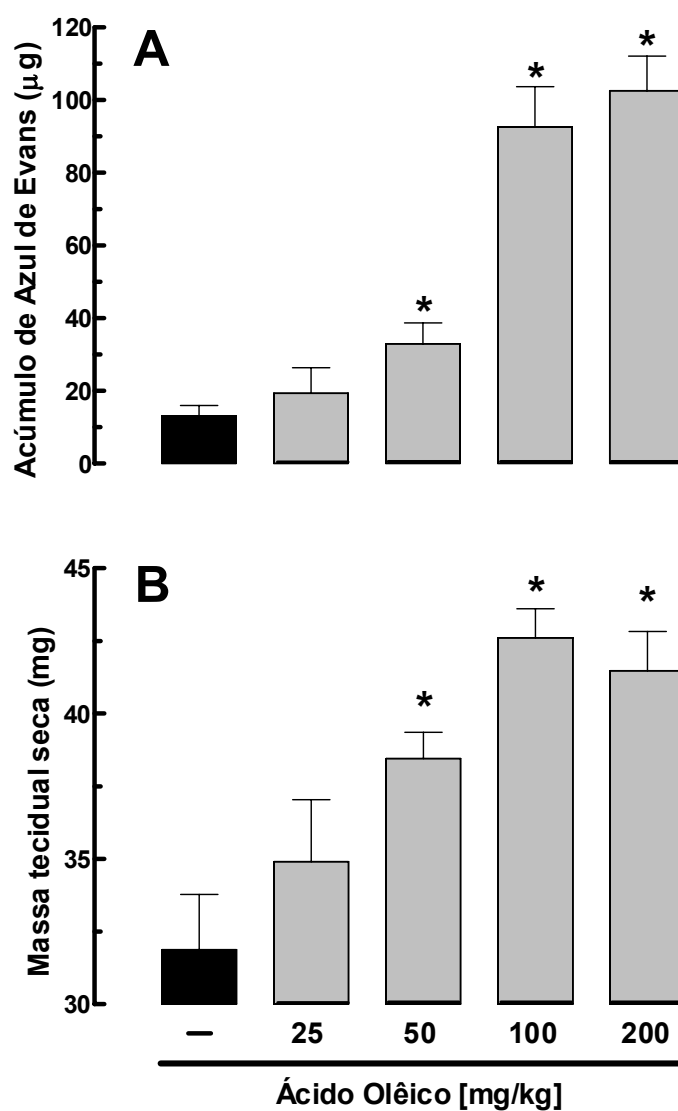


FIGURA 3 - Acúmulo pulmonar de azul de Evans (**A**) e aumento do peso seco de pulmões (**B**) retirados de camundongos, 1 h após a administração intravenosa de ácido olêico (25, 50, 100 ou 200 mg/kg, i.v). Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 8 a 10 experimentos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ (ANOVA seguida do teste de Student-Newman Keuls).

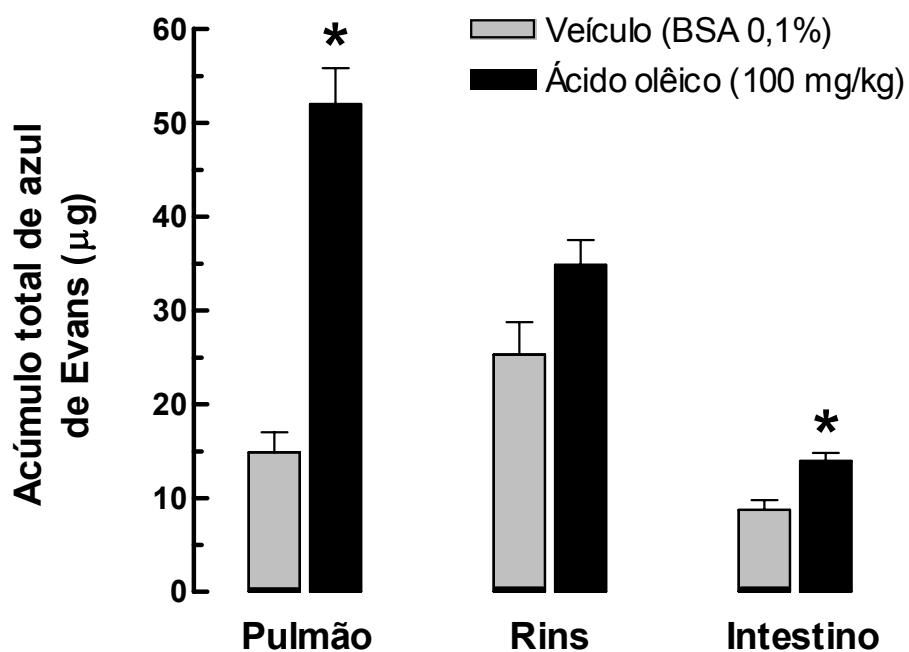


FIGURA 4 - Acúmulo de azul de Evans no pulmão (1h), rins e intestino delgado de camundongos (30 – 35 g) tratados com ácido olêico (100 mg/kg i.v.) ou veículo (BSA 0,1%). Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 10 a 15 experimentos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ (Teste “t” de Student).

A **FIGURA 5** apresenta o decurso temporal do acúmulo de AE, o aumento de massa seca e a relação entre peso úmido e seco de pulmões camundongos induzidos por injeção intravenosa de 100 mg/kg de AO, 1 h após a administração do AE. Embora tenha sido detectado um aumento significativo do acúmulo intrapulmonar de AE, já aos primeiros 5 min, após a administração do AO, o pico máximo de acúmulo do corante ocorreu somente aos 60 min. O teor de corante permaneceu elevado até, pelo menos, 24 h após a administração do AO. Por outro lado, embora a variação peso de massa pulmonar seca também tenha sido significativa já aos 5 min após o AO, os valores sofreram incrementos adicionais bastante discretos em tempos subseqüentes. No entanto, a relação entre peso úmido e peso seco revelou significativo aumento do volume pulmonar, pelo menos, até 1 h, após a administração do AO.

Diferentemente dos experimentos anteriores, nos quais o AE foi administrado **sempre 1 h antes** do AO, também se avaliou o decurso temporal do efeito do AO sobre o acúmulo de AE administrado em **tempos variados após aquele agente**. Nestes experimentos, os animais foram sacrificados **sempre 10 min depois** da administração i.v. do AE. Na **FIGURA 6**, estes experimentos evidenciam que a injeção de AO (100 mg/kg) induziu aumento significativo e de magnitude relativamente constante da permeabilidade vascular pulmonar, apenas nos primeiros 45 min, após a sua administração. Ao administrar-se o corante 1, 4 ou 8 h após o AO, o acúmulo pulmonar do mesmo não diferiu dos valores observados em pulmão de animais controle tratados com 0,1% de BSA. Por fim, é interessante observar que houve uma redução acentuada da permeabilidade vascular quando o corante foi administrado 24 h após a injeção do AO, da ordem de 64% e, do volume pulmonar, como demonstrado pela relação entre o peso úmido e seco.

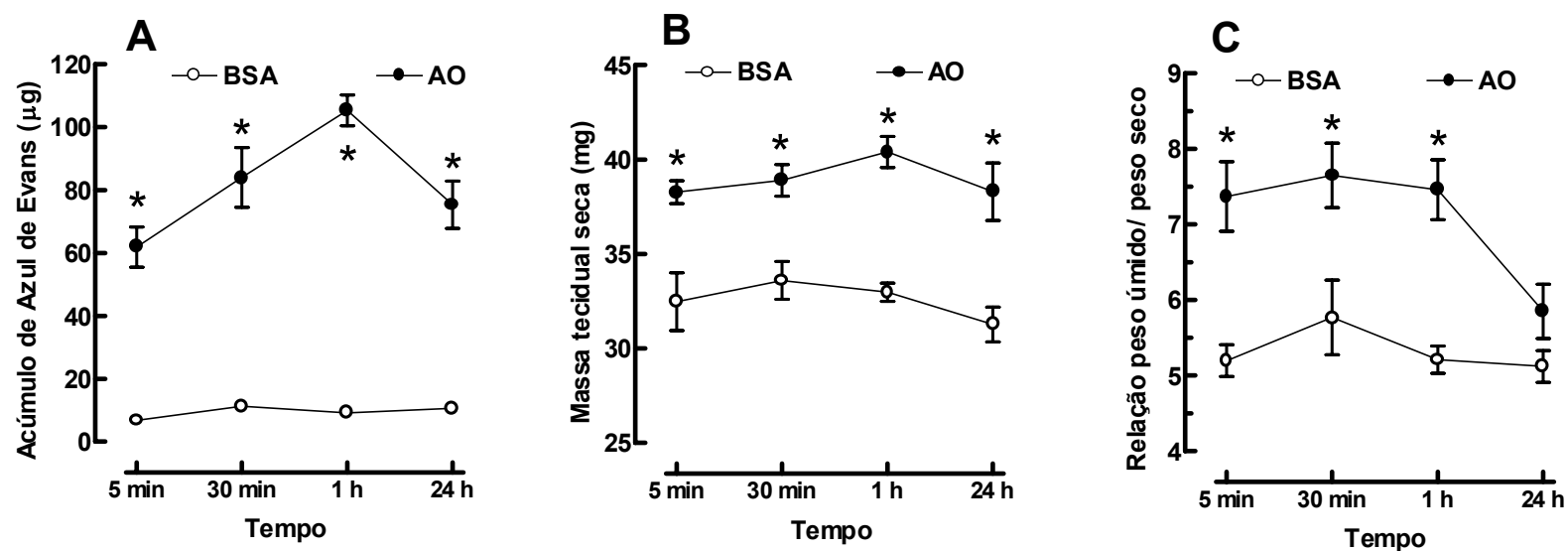


FIGURA 5 - Decurso temporal do acúmulo pulmonar de azul de Evans (**A**), aumento da massa pulmonar seca (**B**) e relação peso úmido e seco pulmonar (**C**) de camundongos submetidos à administração intravenosa de 100 mg/kg de ácido olêico ou veículo (BSA 0,1%). Nestes experimentos, o AE foi administrado 1 h antes do AO. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 8 a 10 experimentos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ (teste de 't' de Student) em relação aos respectivos grupos controles.

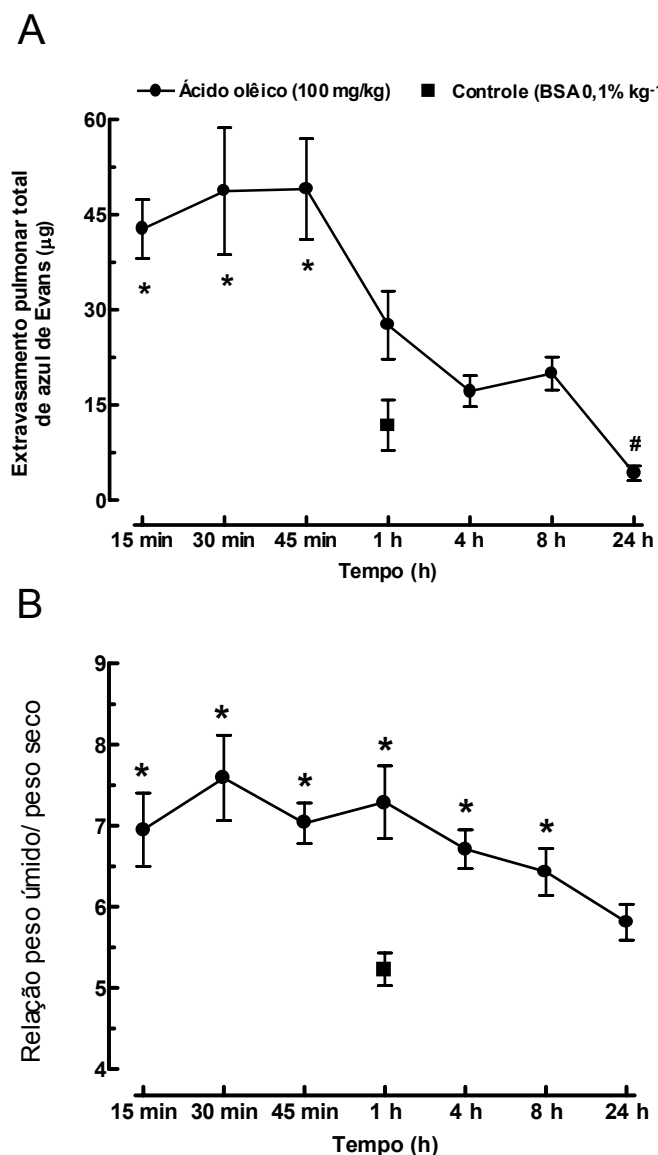


FIGURA 6 – Decurso temporal do acúmulo pulmonar de azul de Evans (**A**) e relação peso úmido e seco pulmonar (**B**) de camundongos **submetidos à administração prévia de AO (100 mg/kg; i.v.) ou veículo (BSA 0,1 %)**. O corante foi administrado 10 min antes do sacrifício dos animais. Cada ponto representa a média \pm o E.P.M. de 8 a 10 experimentos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em relação ao controle BSA 0,1% (teste “t” de Student), enquanto que a cerquilha (#) em relação ao grupo AO 1 h (ANOVA seguida do teste de Student-Newman Keuls).

4.2. Influência do bloqueio da via da cicloxigenase no aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido olêico:

O tratamento prévio com meloxicam, um inibidor preferencial da cicloxigenase-2, nas doses de 1 e 5 mg/kg, inibiu o aumento do extravasamento de AE induzido em pulmões de animais tratados com 100 mg/kg de AO, de modo dependente da dose (**FIGURA 7**). O pré-tratamento com 1 mg/kg ou 5 mg/kg de meloxicam inibiu o extravasamento de AE em 14 e 63%, respectivamente, descontados os valores basais dos grupos controle correspondentes. Contudo, não foi observada qualquer modificação do acúmulo de AE em pulmões de animais controle tratados com 0,1% de BSA que receberam 5 mg/kg de meloxicam, o que sugere um provável efeito inibitório seletivo, desta última, sobre o efeito do AO, e não sobre a permeabilidade vascular pulmonar basal.

Por outro lado, a dexametasona, administrada na dose de 1 mg/kg (48, 24 e 12 h antes do AO, s.c.), também inibiu significativamente e de modo pronunciado o extravasamento vascular de AE, na ordem de 76% (**FIGURA 8**). A exemplo do meloxicam, a dexametasona não alterou o extravasamento basal de AE no grupo controle BSA 0,1%.

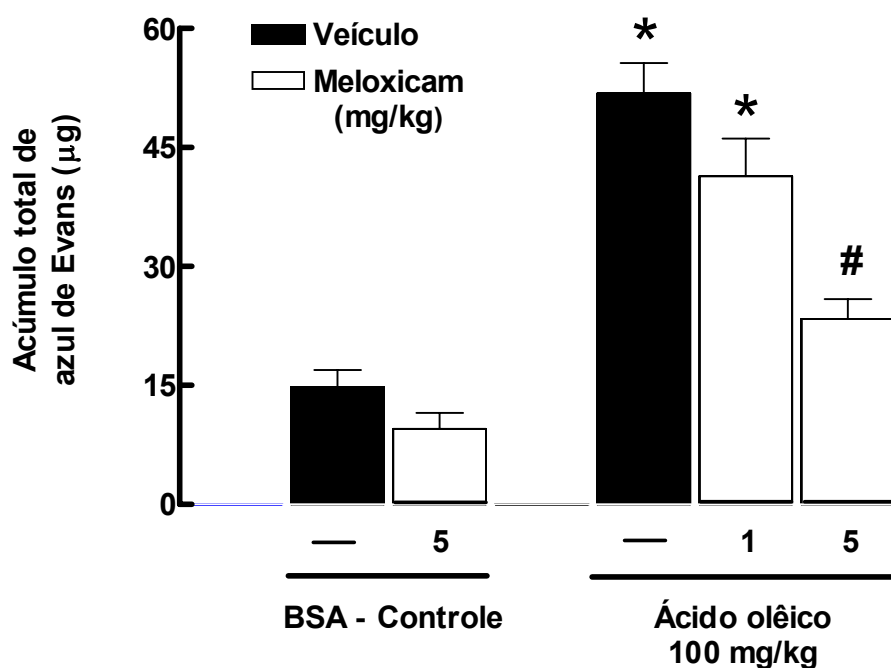


FIGURA 7 – Influência do pré-tratamento com meloxicam (1 ou 5 mg/kg; i.p.) no acúmulo de azul de Evans em pulmão (1 h) de camundongos (30 - 35 g) tratados com 100 mg/kg, i.v., de ácido olêico. Cada barra representa a média \pm EPM de 8 a 10 experimentos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo BSA (0,1%), enquanto que a cerquilha (#), em relação ao grupo controle ácido olêico (ANOVA seguida do teste de Student-Newman Keuls).

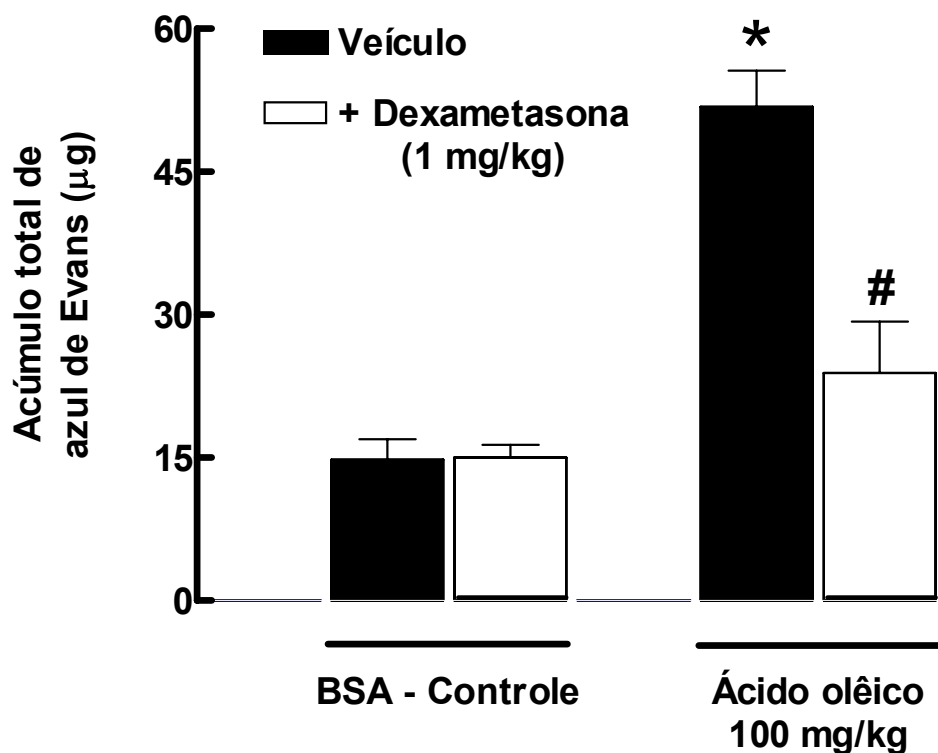


FIGURA 8 – Influência do pré-tratamento com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) no acúmulo de azul de Evans em pulmão de camundongos (30 - 35 g) tratados com 100 mg/kg, i.v., de ácido olêico. Cada barra representa a média + EPM de 8 a 10 experimentos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo BSA (0,1%), enquanto que a cerquilha (#) em relação ao grupo controle ácido olêico (ANOVA seguida do teste de Student-Newman Keuls).

4.3. Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos no acúmulo pulmonar de AE em camundongos tratados com AO:

O pré-tratamento de camundongos com bosentan, antagonista misto (ou dual) de receptores ET_A/ET_B reduziu, significativamente, o acúmulo intrapulmonar de AE, induzido por 100 mg/kg de AO (**FIGURA 9**). O antagonista, nas doses de 15 e 30 mg/kg (administrado i.v. 30 min antes do AO), reduziu o acúmulo de AE em cerca de 28,5% ($76,7 \pm 12,04 \mu\text{g}$) e 71,5% ($39,4 \pm 5,39 \mu\text{g}$), respectivamente; quando comparado ao grupo controle ($98,6 \pm 10,72 \mu\text{g}$) tratado com AO e descontando-se o extravasamento basal observado em pulmões do grupo controle BSA. Em adição, o tratamento prévio de animais controle com 30 mg/kg de bosentan não alterou a permeabilidade vascular basal, quando comparada à do grupo controle pré-tratado com veículo (extravasamento de AE de $14,7 \pm 3,3$ e de $11,8 \pm 4 \mu\text{g}$, respectivamente).

O pré-tratamento com os antagonistas seletivos de receptores ET_A A-127721.5 ou ABT-627, ambos nas doses de 3 ou 5 mg/kg (i.v. 30 min antes), não alterou o extravasamento vascular pulmonar de AE, tanto em camundongos controle BSA quanto em animais tratados com 100 mg/kg de AO (**FIGURA 10**). Porém, quando administrada na dose de 10 mg/kg, o ABT-627 causou elevação significativa de AE da permeabilidade basal de camundongos controle, como também potencializou o aumento da permeabilidade induzido por AO.

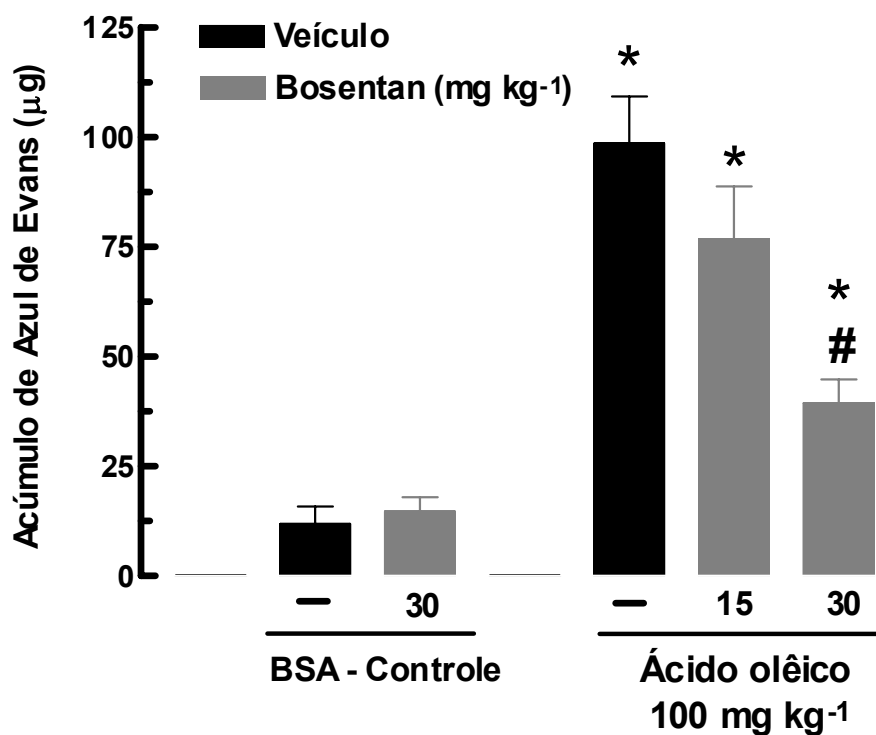


FIGURA 9 – Influência do antagonista misto de receptores ET_A/ET_B , bosentan (15 ou 30 mg/kg, i.v.), no acúmulo de azul de Evans em pulmão de camundongos tratados com 100 mg/kg, i.v., de ácido oléico. Cada barra representa a média + EPM de 6 a 9 experimentos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo BSA (0,1%), enquanto que a cerquilha (#) em relação ao grupo controle ácido oléico (ANOVA seguida do teste de Student-Newman Keuls).

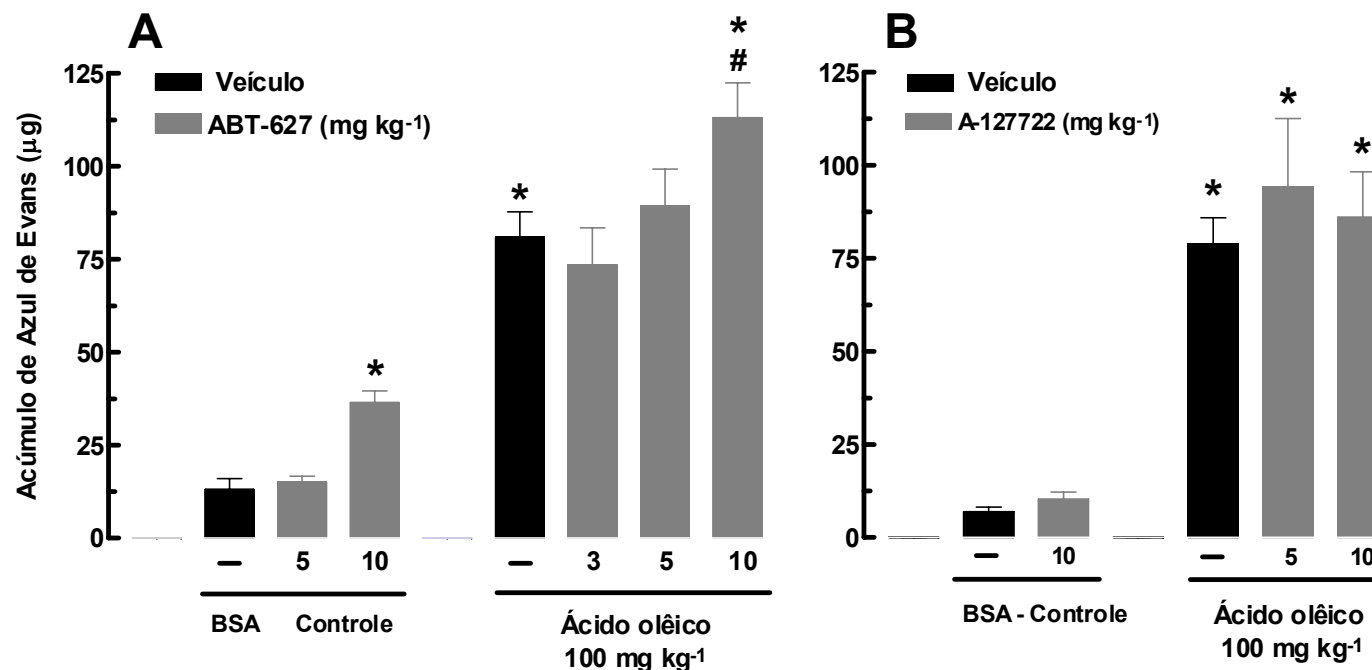


FIGURA 10 – Influência do **ABT-627** (3, 5 ou 10 mg/kg ; i.v.; painel **A**) ou **A-127722.5** (5 ou 10 mg/kg ; i.v.; painel **B**), antagonistas seletivos ET_A , no acúmulo pulmonar de azul de Evans em camundongos tratados com ácido oléico (100 mg/kg , i.v.), respectivamente. Cada barra representa a média \pm EPM de 6 a 9 experimentos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo BSA (0,1 %), e as cerquilhas (#) em relação ao grupo veículo controle ácido oléico (ANOVA seguida do teste de Student-Newman Keuls).

Em outra série de experimentos, o pré-tratamento com antagonistas endotelinérgicos seletivos para receptores ET_B diminuíram significativamente o acúmulo pulmonar de AE, em animais que receberam AO (100 mg/kg). Estes experimentos revelaram que o antagonista seletivo de receptores ET_B Ro-468443, nas doses de 3 ou 10 mg/kg, reduziu o acúmulo de AE para 30,3 e 47,3%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle AO. O acúmulo pulmonar de AE em animais controle não foi alterado pelo tratamento de 10 mg/kg de Ro-468443, quando comparado ao grupo controle pré-tratado com veículo (**FIGURA 11**).

De modo semelhante, o antagonista seletivo A-192621, nas doses de 10, 15 ou 30 mg/kg também reduziu o acúmulo de AE para 34, 43 e 80%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle AO. Este efeito inibitório do A-192621 (30 mg/kg) sobre o acúmulo de AE não foi observado no grupo controle (tratado com salina ao invés de AO), quando comparado ao grupo controle pré-tratado com o veículo correspondente (**FIGURA 11**).

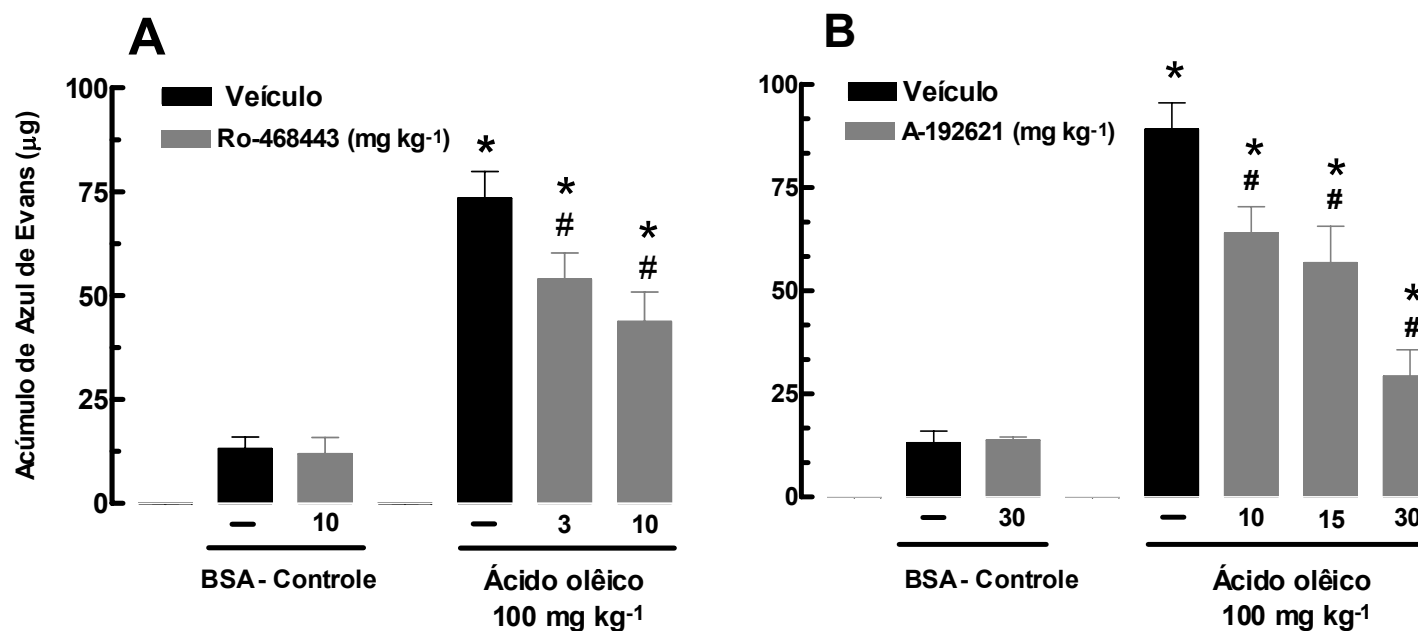


FIGURA 11 – Influência do **Ro-468443** (3 ou 10 mg/kg; i.v.; painel **A**) ou **A-192621** (10, 15 ou 30 mg/kg; i.v.), antagonistas seletivos de receptores ET_B, no acúmulo de azul de Evans em pulmões de camundongos tratados com AO (100 mg/kg, i.v.), respectivamente. Cada barra representa a média \pm EPM de 6 a 9 experimentos. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo BSA (0,1 %), enquanto as cerquilhas (#) em relação ao grupo veículo controle AO (ANOVA seguida do teste de Student-Newman Keuls).

4.4. Influência de agonistas endotelinérgicos no acúmulo pulmonar de AE:

A administração de ET-1 exógena ou de agonistas endotelinérgicos seletivos para receptores ET_B não alterou os níveis intrapulmonares de AE. Embora as doses de 0,3 e 1 nmol/kg de ET-1 tenham causado um aumento de 18,3 e 25,1% no acúmulo pulmonar de AE, respectivamente, quando comparado ao respectivo grupo veículo, estes aumentos não foram significativos (**FIGURA 12A**). Além disso, a maior dose administrada de ET-1 (3 nmol/kg) também não causou alteração do acúmulo de AE.

Por outro lado, a injeção intravenosa de SX6c tendeu a diminuir a concentração pulmonar do corante, porém esse efeito não atingiu significância estatística com nenhuma das doses administradas (0,3, 1 ou 3 nmol/kg; **FIGURA 12B**). Da mesma maneira, dois outros agonistas seletivos de receptores ET_B, o BQ-3020 e o IRL-1620, nas doses de 0,3, 1 e 3 nmol/kg também não alteraram o acúmulo intrapulmonar de AE (**FIGURA 12C e D**).

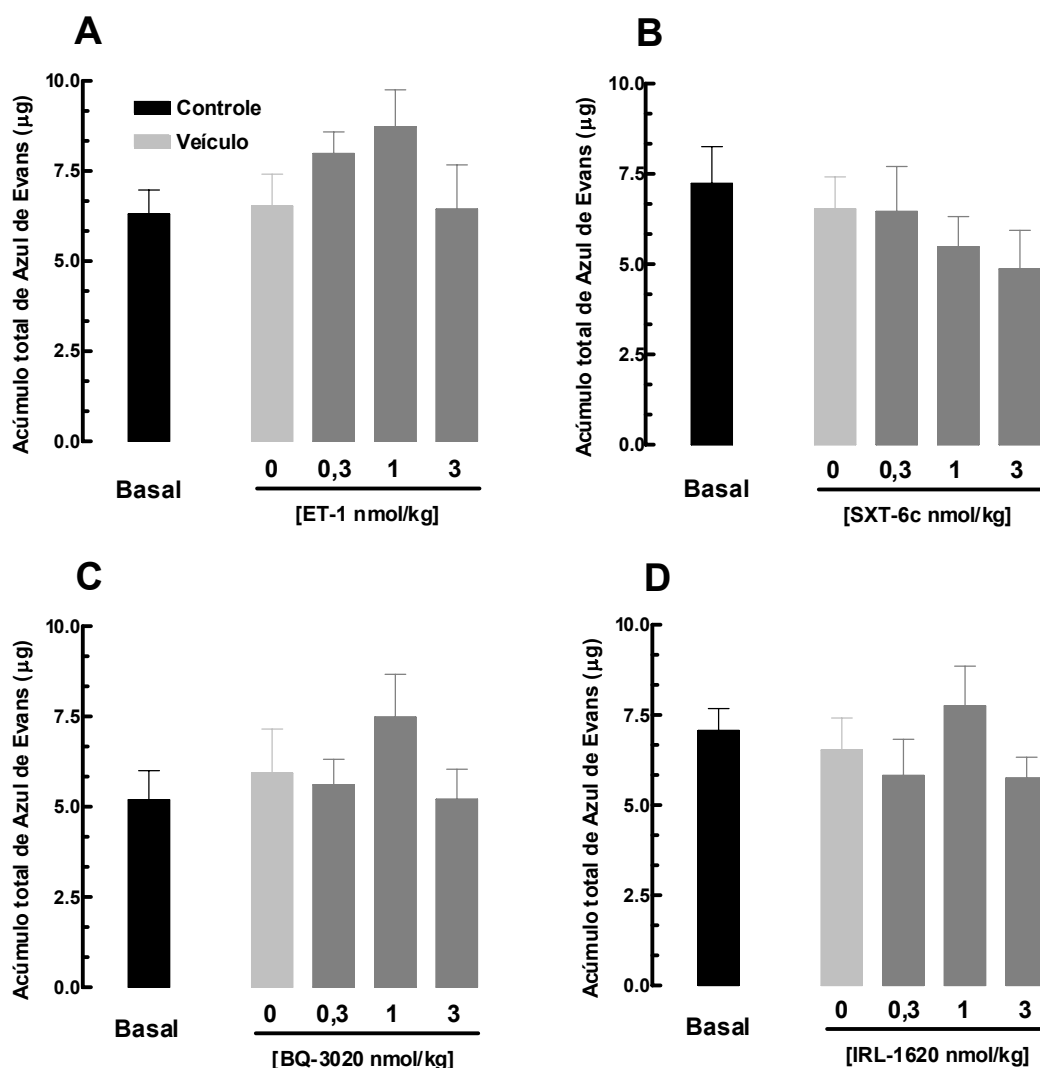


FIGURA 12 – Ações da administração intravenosa (0,3, 1 ou 3 nmol/kg) de **endotelina-1 (A)** ou dos agonistas seletivos ET_B , **sarafotoxina-6c (B)**, **BQ-3020 (C)**, **IRL-1620 (D)**, ou os respectivos veículos, no acúmulo pulmonar de azul de Evans em camundongos. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 7 a 10 experimentos. ($P > 0,05$, ANOVA seguida do teste de Student-Newman Keuls).

4.5. Efeitos do AO sobre a celularidade em amostras de lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos – Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos:

O estudo do decurso temporal (1 a 72 h) das variações de celularidade em amostras do BAL de camundongos tratados com AO (**100 mg/kg; i.v.**), sem a prévia administração de AE, demonstrou elevação significativa do número total de leucócitos a partir da segunda hora após a injeção (**FIGURA 13**). O pico máximo de leucócitos totais ocorreu no tempo de 48 h. Contagens diferenciais destas amostras de BAL revelaram que a população de células coletadas consistia essencialmente de leucócitos mononucleares apenas, ou seja, não foi detectada a presença de leucócitos polimorfonucleares (dados não apresentados).

A administração de **200 mg/kg** de AO induziu um aumento maior da celularidade total de leucócitos no BAL, 4 h após sua administração, quando comparado ao observado após 100 mg/kg do agente (comparar **FIGURA 13** com **FIGURA 14A**). Além disso, em contraste com os resultados obtidos com a dose de 100 mg/kg de AO, a dose de 200 mg/kg não só causou um aumento do número de leucócitos mononucleares presentes no BAL, como também o aparecimento de leucócitos polimorfonucleares nas amostras (**FIGURAS 14A e 14C**).

O pré-tratamento com 30 mg/kg de bosentan, antagonista misto ET_A/ET_B, em camundongos tratados com 200 mg/kg de AO, diminuiu significativamente a concentração de leucócitos polimorfonucleares sem, no entanto, alterar os níveis de leucócitos mononucleares presentes no BAL 4 h após injeção do agente lesivo (**FIGURA 14**). Além disso, o antagonista misto não afetou significativamente os níveis de celularidade total basal do grupo controle (veículo BSA).

O pré-tratamento i.v. com 10 mg/kg de Ro-468443, antagonista seletivo de receptores ET_B, também induziu redução significativa na concentração de leucócitos polimorfonucleares no BAL de camundongos submetidos à dose de 200 mg/kg de AO (**FIGURA 14**). A população de leucócitos mononucleares, bem como o número total de leucócitos em BAL de animais tratados com AO, não foi afetada com o pré-tratamento com este antagonista. Os níveis de celularidade basal (grupo veículo BSA) não foram alterados com o pré-tratamento com o antagonista, na ausência da administração de AO.

Diferentemente do que foi observado com o bosentan e o Ro-468443, o pré-tratamento com ABT-627 (5 mg/kg, i.v.), antagonista seletivo para receptores endotelinérgicos do tipo ET_B, reduziu significativamente a celularidade total em amostras de BAL de camundongos submetidos à administração de AO (200 mg/kg; **FIGURA 14**). Além disso, esse antagonista também reduziu tanto a população de leucócitos mononucleares quanto os polimorfonucleares. No entanto, a população residente de leucócitos alveolares nas amostras de BAL de camundongos controle (grupo veículo BSA) não foram alteradas com o tratamento com ABT-627.

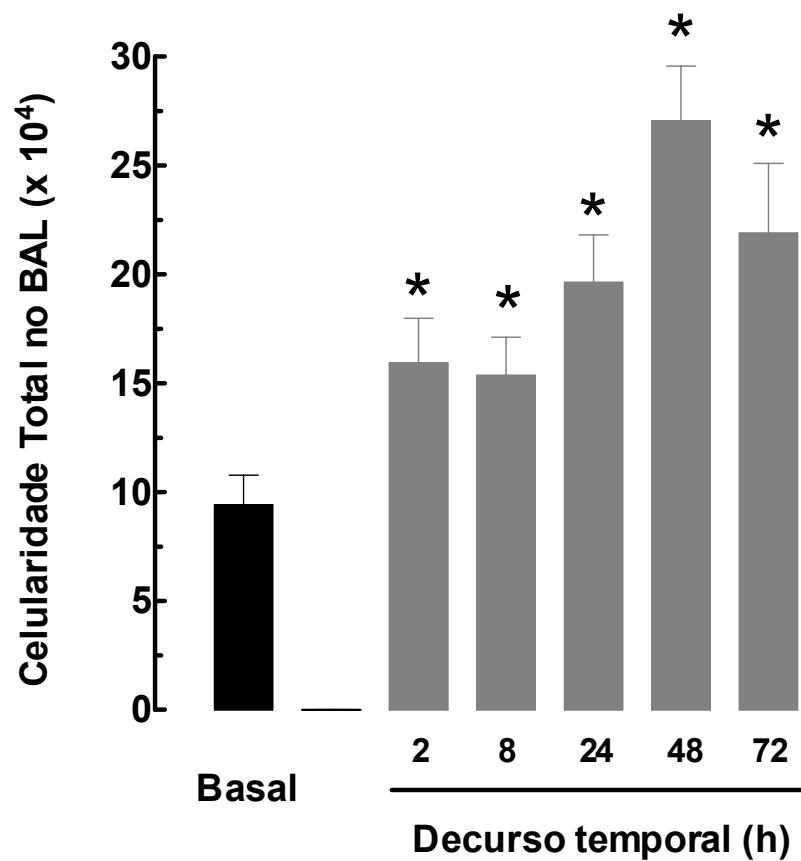


FIGURA 13 – Decurso temporal do aumento de celularidade presente em amostras do BAL de camundongos tratados com ácido olêico (100 mg/kg, i.v.). Cada barra demonstra a média \pm E.P.M. de 8 a 15 experimentos cada. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ (ANOVA seguida do teste de Student-Newman Keuls) em relação ao grupo basal BSA 0,1%.

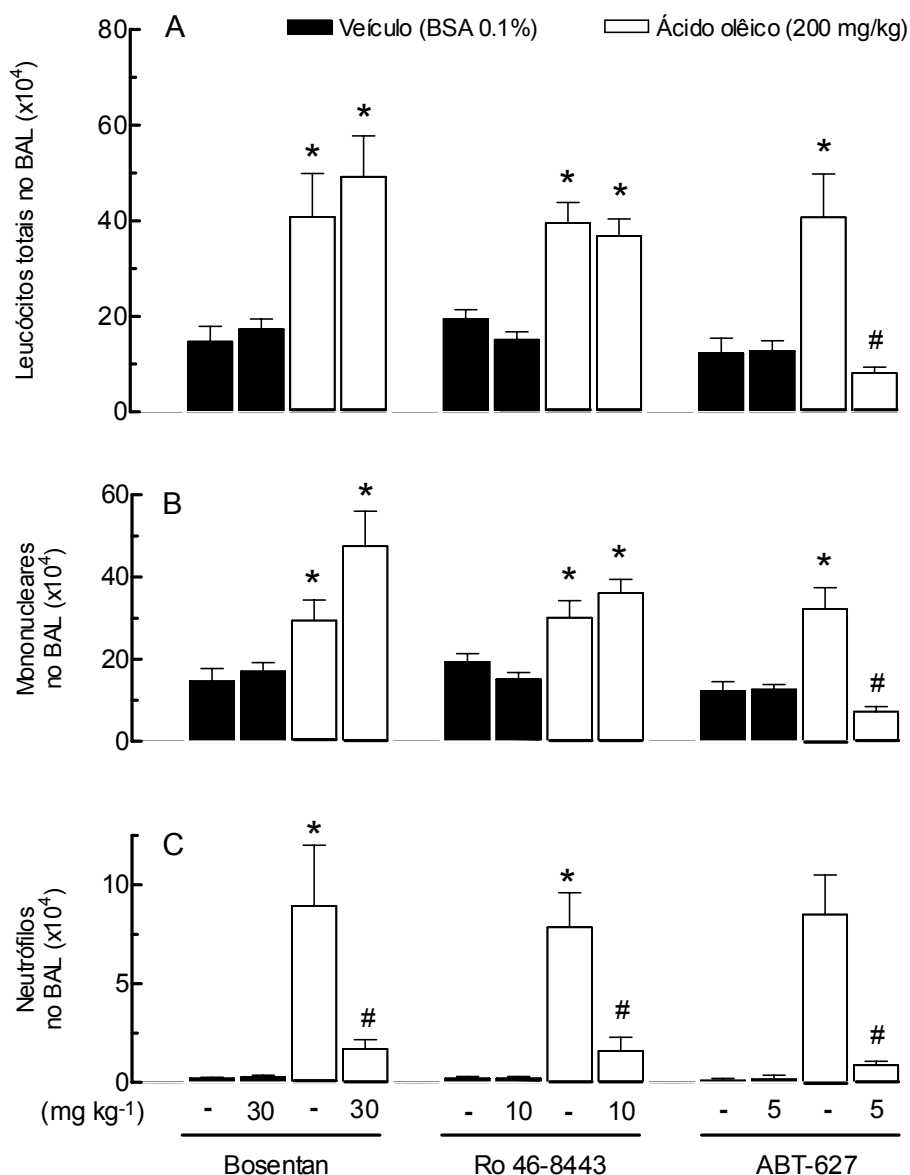


FIGURA 14 – Influência do **bosentan** (30 mg/kg, i.v.), antagonista misto ET_A/ET_B , **Ro-468443** (10 mg/kg, i.v.), antagonista seletivo ET_B e **ABT-627** (5 mg/kg, i.v.), antagonista seletivo ET_A , na celularidade total (painel **A**) e específica (leucócitos mononucleares no painel **B** e polimorfonucleares no painel **C**), no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos tratados com AO (200 mg/kg, i.v.). O BAL foi realizado 4 h, após a administração do AO. Cada barra demonstra a média \pm E.P.M. de 8 a 15 experimentos cada. Os asteriscos (*) denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle tratado com veículo (BSA 0,1%), enquanto que as cerquilhas (#) em relação ao grupo controle AO (ANOVA seguida pelo teste de Student Newman-Keuls).

4.6. Análise da atividade da mieloperoxidase no pulmão de camundongos tratados com AO a 200 mg/kg:

A análise da concentração da MPO em amostras de pulmão de camundongos, tratados com 200 mg/kg de AO (i.v.), não demonstrou concentração enzimática significativa. A leitura da densidade ótica (DO) das amostras de pulmão de camundongos controle, tratados i.v. com BSA 0,1%, acusou a média de $0,0657 \pm 0,0012$, enquanto que, a média da DO das amostras dos animais tratados com AO foi da ordem de $0,0575 \pm 0,001$. Salienta-se que este experimento foi repetido duas vezes e, o grupo controle positivo para a MPO foi conduzido utilizando-se amostras de orelha de camundongos tratados com ácido araquidônico.

4.7. Avaliação histopatológica dos pulmões de camundongos pré-tratados com antagonistas endotelinérgicos e submetidos ao ácido olêico:

A análise histopatológica de pulmão de camundongos tratados com a dose de 200 mg/kg de AO evidenciou lesão tecidual de intensidade dependente do tempo transcorrido desde a injeção. Todos os índices histopatológicos analisados apresentaram-se elevados significativamente no tempo de 4 horas, após a administração do AO, em relação ao grupo controle tratado apenas com BSA (**FIGURA 15**). Cumpre destacar que estes resultados foram submetidos a análise estatística usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Contudo, para efeitos de comparação, os cortes de pulmões obtidos 4 h após a administração do AO apresentaram um aumento médio do **infiltrado de células inflamatórias** situado entre os graus 2 (moderado) e 3 (abundante), enquanto que as amostras controle apresentaram grau 0 (ausente). Esta diferença quanto ao infiltrado celular em pulmões de animais tratados com AO ou BSA pode ser apreciado na comparação dos cortes histológicos apresentados na **FIGURA 16**.

O **índice hemorrágico** demonstrou que o tratamento com AO (200 mg/kg) induz discreta hemorragia em 1 h e moderada no tempo de 4 h (**FIGURA 15B**; **FIGURA 17**).

A **congestão vascular parenquimatosa** ficou em torno dos graus 1 e 2, isto é, discreto a moderado, no tempo de 1 h e, 2 a 3, moderado a abundante, no tempo de 4 h, após a administração de AO (**FIGURA 15C**; **FIGURA 18**).

O **edema intersticial** induzido pelo AO ficou abaixo de 1 grau (discreto) no grupo 1 h e, abaixo de 2 graus (moderado), no grupo 4 h (**FIGURA 15D**; **FIGURA 19**).

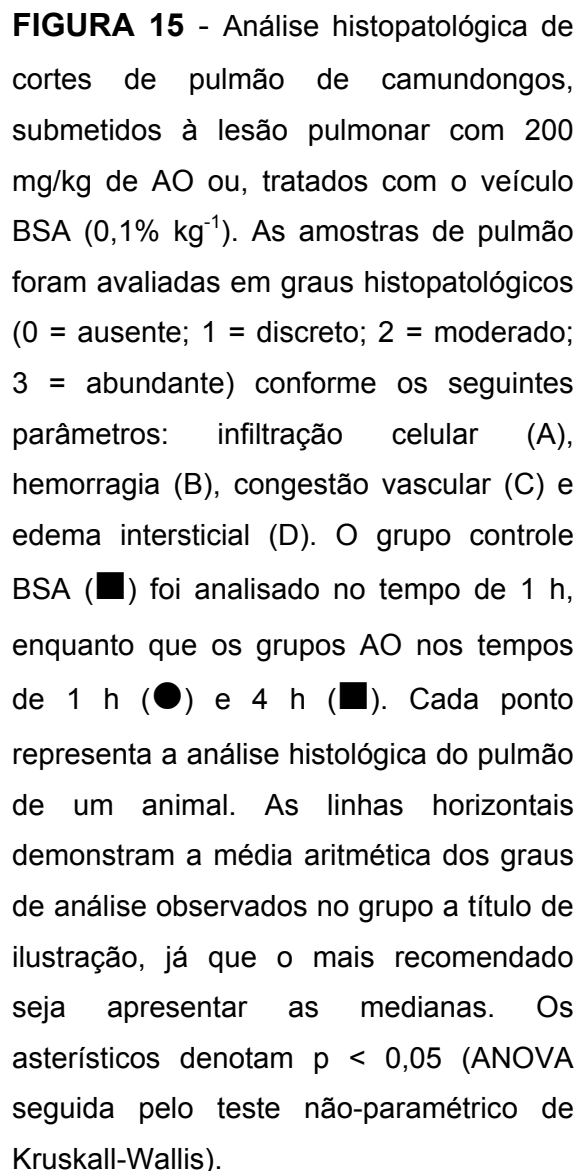




Figura 16 – Cortes histopatológicos de pulmão de camundongo submetidos ao tratamento com 200 mg/kg de ácido olêico (AO) e sacrificados no tempo de 4 h. No painel **A**, apresenta-se corte de pulmão com parênquima normal (grupo veículo BSA 0,1%), enquanto que em **B** e **C** demonstra-se áreas parenquimatosas com abundante infiltrado inflamatório (grupos AO). Coloração com hematoxilina-eosina.

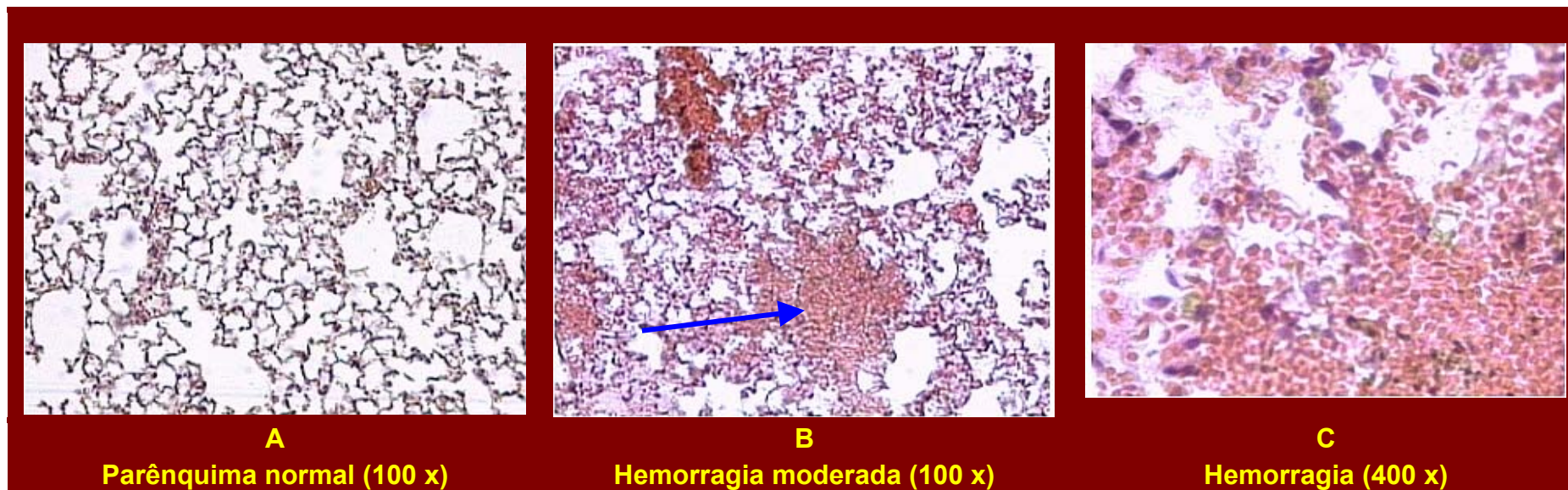


FIGURA 17 – Cortes histopatológicos de pulmão de camundongo submetidos ao tratamento com 200 mg/kg de ácido olêico (AO) e sacrificados no tempo de 4 h. No painel **A**, apresenta-se corte de pulmão com parênquima normal (grupo veículo BSA 0,1%), enquanto que em **B** e **C** demonstra-se áreas parenquimatosas com hemorragia moderada (grupos AO). Coloração com hematoxilina-eosina.

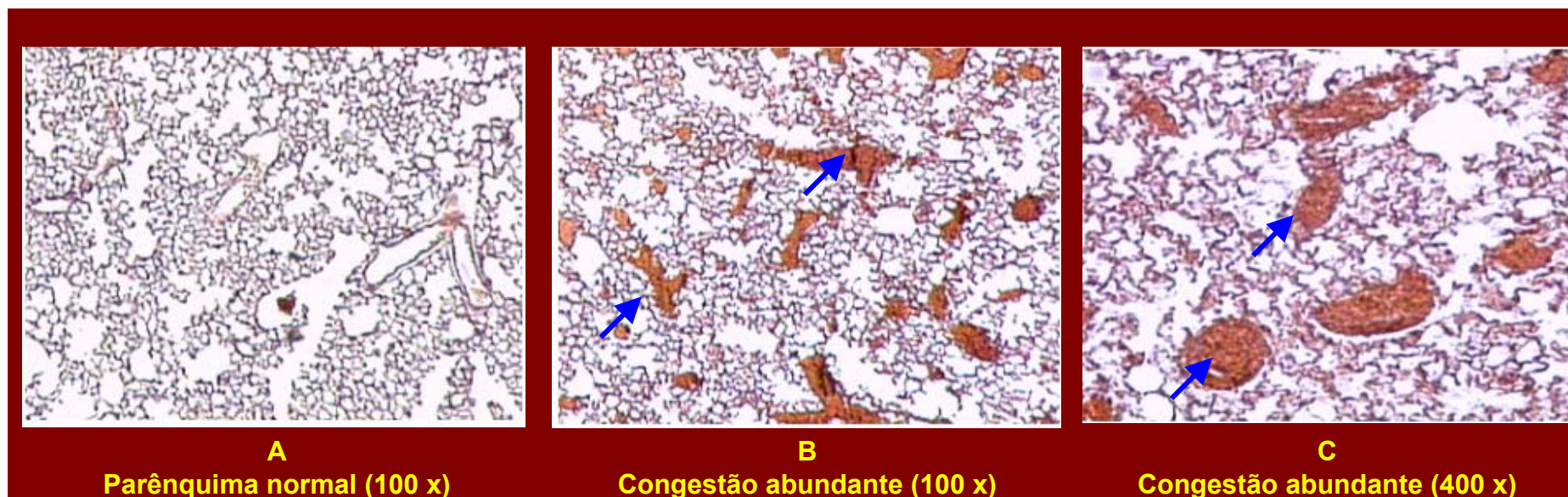


FIGURA 18 – Cortes histopatológicos de pulmão de camundongo submetidos ao tratamento com 200 mg/kg de ácido olêico (AO) e sacrificados no tempo de 4 h. No painel **A**, apresenta-se corte de pulmão com parênquima normal (grupo veículo BSA 0,1%), enquanto que em **B** e **C** demonstra-se áreas parenquimatosas com congestão vascular abundante (grupos AO). Coloração com hematoxilina-eosina.

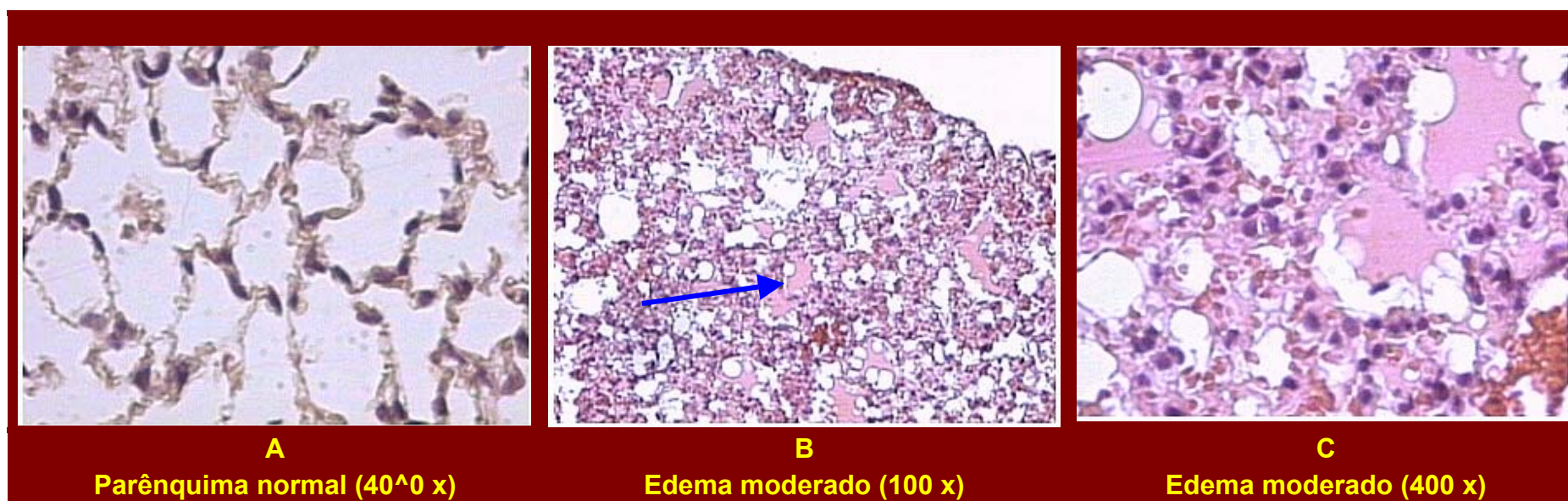


FIGURA 19 – Cortes histopatológicos de pulmão de camundongo submetidos ao tratamento com 200 mg/kg de ácido olêico (AO) e sacrificados no tempo de 4 h. No painel **A**, apresenta-se corte de pulmão com parênquima normal (grupo veículo BSA 0,1%), enquanto que nos painéis **B** e **C** demonstra-se áreas parenquimatosas com edema moderado (grupos AO). Coloração com hematoxilina-eosina.

Conforme ilustrado na **FIGURA 20**, o pré-tratamento com bosentan (30 mg/kg; antagonista misto de receptores ET_A/ET_B), Ro-468443 (10 mg/kg), A-192621 (30 mg/kg; ambos antagonistas seletivos de receptores ET_B), ABT-627 (5 mg/kg) ou A-127722.5 (10 mg/kg; ambos antagonistas seletivos de receptores ET_A) causou inibições significativas do aumento do ***infiltrado celular inflamatório*** desencadeado por 200 mg/kg de AO. As amostras dos grupos pré-tratados com os respectivos antagonistas endotelinérgicos apresentaram redução do infiltrado celular de valores situados entre os graus 2 e 3 para valores com graus 0 a 1. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com os antagonistas também induziu redução significativa do índice de ***hemorragia*** de moderado (grau 2) para inferior ao discreto (grau 1). O pré-tratamento com o Ro-468443 (10 mg/kg) reduziu o índice de hemorragia, porém não foi significativo, ao contrário do pré-tratamento com o A-192621 (30 mg/kg) que reduziu o índice abaixo do grau 1 (discreto). Estes resultados estão apresentados na **FIGURA 21**.

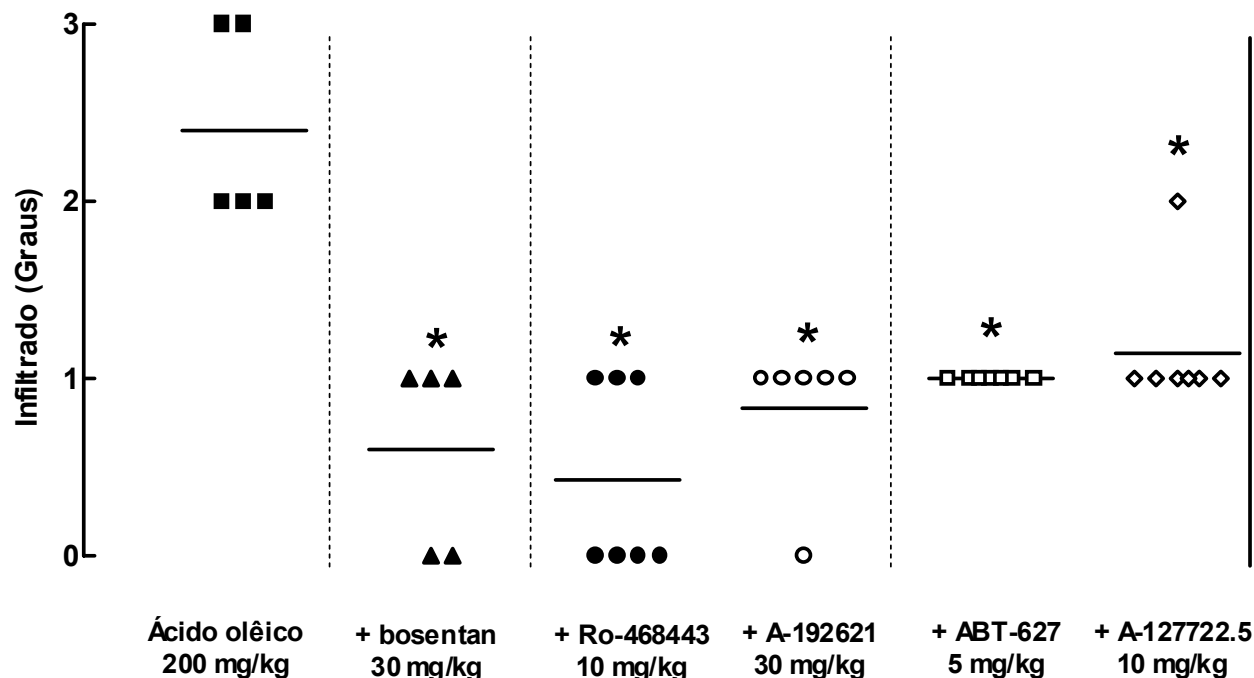
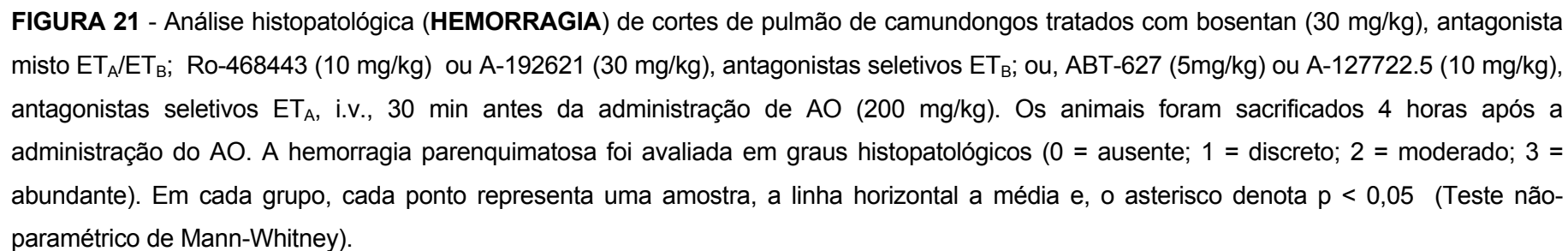


FIGURA 20 - Análise histopatológica (**INFILTRADO INFLAMATÓRIO**) de cortes de pulmão de camundongos tratados com bosentan (30 mg/kg), antagonista misto ET_A/ET_B ; Ro-468443 (10 mg/kg) ou A-192621 (30 mg/kg), antagonistas seletivos ET_B ; ou, ABT-627 (5mg/kg) ou A-127722.5 (10 mg/kg), antagonistas seletivos ET_A , i.v., 30 min antes da administração de AO (200 mg/kg). Os animais foram sacrificados 4 h após a administração do AO. O infiltrado inflamatório foi avaliado em graus histopatológicos (0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = abundante). Em cada grupo, cada ponto representa uma amostra, a linha horizontal a média e, o asterisco denota $p < 0,05$ (Teste não-paramétrico de Mann-Whitney).



Em outro grupo de experimentos, o pré-tratamento dos animais com bosentan (30 mg/kg), antagonista misto de receptores ET_A e ET_B , reduziu o índice de **congestão vascular** no tempo de 4 h, causado pela administração de 200 mg/kg de AO. Porém, não foi suficientemente significativa (**FIGURA 22**). O pré-tratamento com Ro-468443, na dose de 10 mg/kg, não foi efetivo em reduzir o índice de congestão vascular porém, o A-192621, na dose de 30 mg/kg, outro antagonista seletivo de receptores ET_B , reduziu significativamente a congestão vascular de moderado (> 2) para próximo de discreto (grau 1). Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com antagonistas seletivos de receptores ET_A , ABT-627 ou A-127722.5, nas doses de 5 e 10 mg/kg, respectivamente, não foi eficaz em reduzir significativamente o índice de congestão vascular.

Em adição, o pré-tratamento dos animais com o antagonista misto de receptores ET_A/ET_B , bosentan (30 mg/kg), antes da administração de AO (200 mg/kg; i.v), não reduziu o índice de **edema intersticial** (**FIGURA 23**). O pré-tratamento com os antagonistas seletivos de receptores ET_B , Ro-468443 (10 mg/kg) ou A-192621 (30 mg/kg) foram efetivos em reduzir o edema intersticial. No entanto, somente o pré-tratamento com Ro-468443 mostrou significância, reduzindo o índice de edema de discreto (> 1) para quase ausente (grau 0). O pré-tratamento com ABT-627 (5 mg/kg) ou A-127722.5 (10 mg/kg), antagonistas seletivos de receptores ET_A , não foi eficaz de reduzir o edema intersticial.

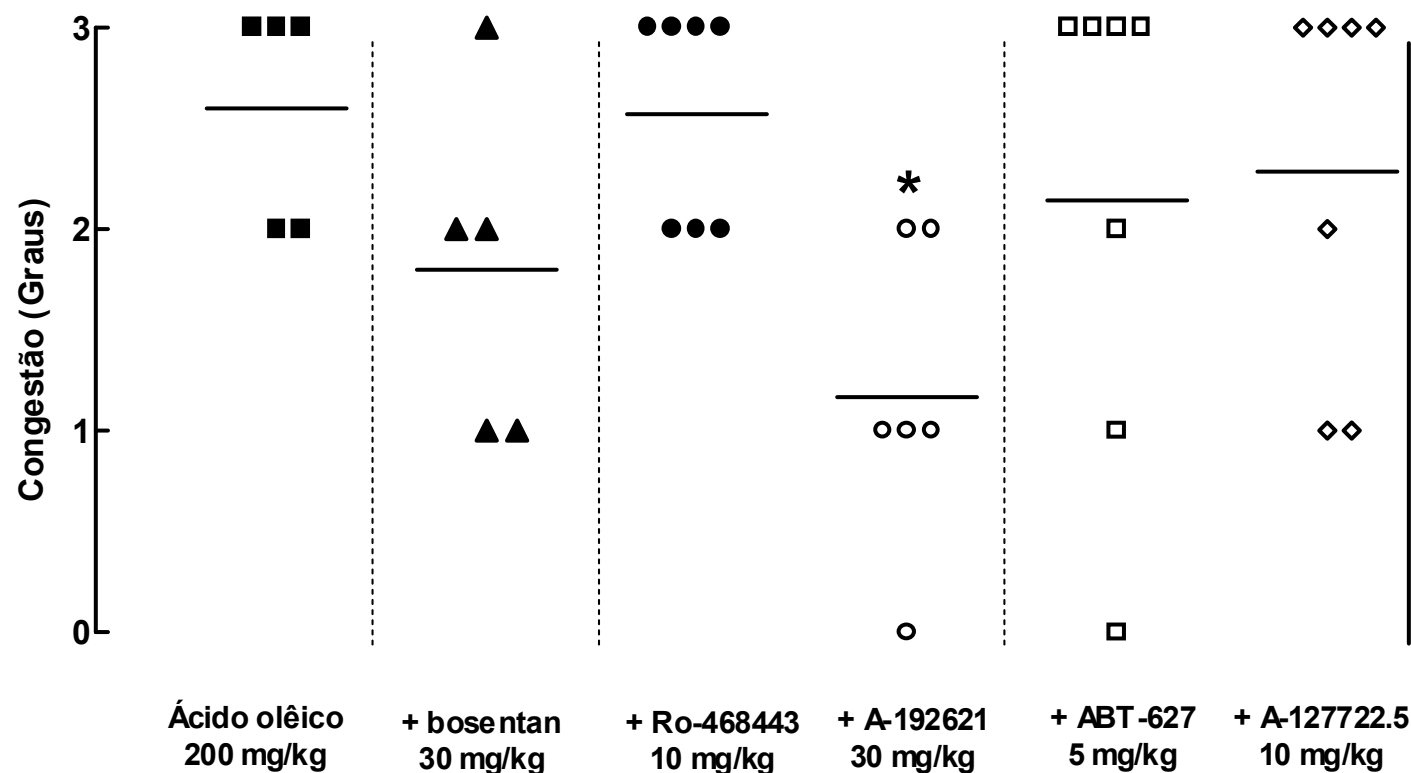


FIGURA 22 - Análise histopatológica (**CONGESTÃO VASCULAR**) de cortes de pulmão de camundongos tratados com bosentan (30 mg/kg), antagonista misto ET_A/ET_B; Ro-468443 (10 mg/kg) ou A-192621 (30 mg/kg), antagonistas seletivos ET_B; ou, ABT-627 (5mg/kg) ou A-127722.5 (10 mg/kg), antagonistas seletivos ET_A, i.v., 30 min antes da administração de AO (200 mg/kg). Os animais foram sacrificados 4 horas após a administração do AO. O infiltrado inflamatório foi avaliado em graus histopatológicos (0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = abundante). Em cada grupo, cada ponto representa uma amostra, a linha horizontal a média e, o asterisco denota $p < 0,05$ (Teste não-paramétrico de Mann-Whitney).

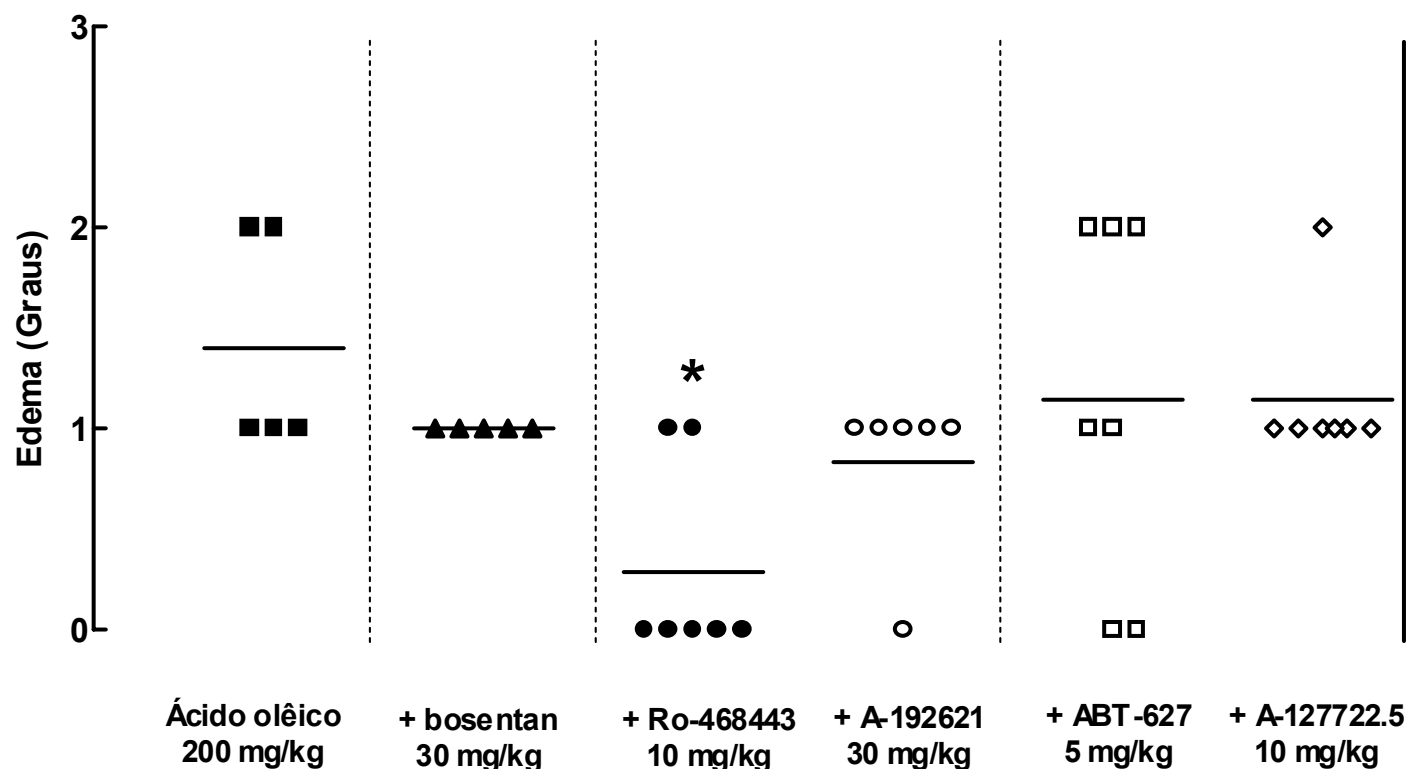


FIGURA 23 - Análise histopatológica (**EDEMA INTERSTICIAL**) de cortes de pulmão de camundongos tratados com bosentan (30 mg/kg), antagonista misto ET_A/ET_B; Ro-468443 (10 mg/kg) ou A-192621 (30 mg/kg), antagonistas seletivos ET_B; ou, ABT-627 (5mg/kg) ou A-127722.5 (10 mg/kg), antagonistas seletivos ET_A, i.v., 30 min antes da administração de AO (200 mg/kg). Os animais foram sacrificados 4 horas após a administração do AO. O infiltrado inflamatório foi avaliado em graus histopatológicos (0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = abundante). Em cada grupo, cada ponto representa uma amostra, a linha horizontal a média e, o asterisco denota $p < 0,05$ (Teste não-paramétrico de Mann-Whitney).

Os resultados do presente estudo demonstraram que a lesão pulmonar induzida por AO em camundongos é um modelo experimental viável, capaz de servir de base para o estudo da permeabilidade vascular e da celularidade leucocitária, envolvidas na fisiopatologia da SARA. Além disso, os resultados obtidos foram os primeiros a demonstrarem que as ETs endógenas, através da utilização de antagonistas para receptores endotelinérgicos, medeiam, em parte, a fisiopatologia da SARA experimental, induzida por AO em camundongos.

5.1. O MODELO DE LESÃO PULMONAR INDUZIDO POR AO EM CAMUNDONGOS:

No presente trabalho, inicialmente avaliou-se a letalidade do AO em camundongos fêmeas e machos (resultados não demonstrados), com o objetivo de averiguar o tempo de sobrevida dos animais frente a distintas doses de AO (25 a 400 mg/kg; dissolvido em BSA 0,1%; i.v.), durante as primeiras 24 horas após sua administração e, selecionar uma dose que não apresentasse letalidade elevada para emprego nos experimentos subseqüentes. O AO nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg causou, respectivamente, 11, 37 e 83% de mortes em camundongos de ambos os sexos, em 24 horas de observação. Não foram observadas mortes nas primeiras 12 horas após a injeção de 100 mg/kg de AO. Estes resultados estão de acordo com a DL_{50} de 230 ± 18 mg/kg do AO, i.v., descrita para camundongos (**The Merck Index, 1996**), bem como com relato prévio da ausência de mortes nas primeiras 2 horas após administração de 200 mg/kg (**DEJUN et al. 1996**). Contrasta, contudo, com os

resultados de **HAKKINEN et al. (1983)**, que relataram haver 80% de sobrevivência de camundongos fêmeas tratadas com 800 mg/kg de AO, i.v.

Em seguida, procuramos padronizar os parâmetros experimentais de permeabilidade vascular pulmonar em camundongos submetidos ao tratamento com AO. A administração i.v. de AO, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, elevou significativamente o acúmulo intrapulmonar de AE para 2,5, 7,1 e 7,8 vezes, respectivamente; como também, o peso seco dos pulmões para 21, 34 e 30%. Em adição, também ocorreu elevação do acúmulo de AE no intestino delgado sem, no entanto, alterar os parâmetros de acúmulo nos rins. O decurso temporal do acúmulo de AE e massa pulmonar seca de camundongos submetidos à administração de 100 mg/kg de AO (i.v.) demonstrou rápido aumento dos parâmetros analisados. Mesmo havendo aumento significativo do acúmulo intrapulmonar de AE, já aos primeiros 5 min, após a administração do AO, o pico máximo de acúmulo do corante ocorreu aos 60 min. Além disso, o teor de corante permaneceu elevado até 24 h após a administração do AO, pelo menos. Por outro lado, embora a variação peso de massa pulmonar seca também tenha sido significativa já a partir dos 5 min após o AO, os valores sofreram incrementos adicionais bastante discretos em tempos subseqüentes. Estes resultados são condizentes com os de outros estudos, relacionados a índices de permeabilidade vascular pulmonar. Em ratos, a administração intravenosa de 60 mg/kg de AO (i.v.), eleva a permeabilidade vascular pulmonar em 10 vezes (**BALL et al. (1989)**), após os 5 primeiros minutos. Enquanto que, em cobaias, no brônquio proximal e distal, há acúmulo significativo de AE, após os 15 min da administração do AO (**MORIUCHI et al., 1995**). Os resultados do presente estudo, em conjunto com os existentes na literatura,

demonstram que a permeabilidade vascular pulmonar aumenta rapidamente após administração intravenosa de AO. Esta conclusão encontra respaldo nos resultados obtidos quando o AO (100 mg/kg; i.v.) foi administrado em diferentes tempos antes da administração intravenosa de AE. A administração de AO induziu aumento significativo e de magnitude relativamente constante da permeabilidade vascular pulmonar, apenas nos primeiros 45 min após a sua administração. Ao administrar-se o corante 1, 4 ou 8 h após o AO, o acúmulo pulmonar do mesmo não diferiu dos valores observados em pulmão de animais controle tratados com 0,1% de BSA. Torna-se, ainda, imperativo comparar os resultados obtidos no presente trabalho com os resultados relatados por **DEJUN** e colaboradores (1996). Os autores utilizando camundongos (30 - 40 g) da linhagem "Kunming", constataram que há 13,4% no aumento do peso seco dos pulmões dos animais, após 1 h da administração de AO (200 mg/kg; i.v.). No corrente estudo, a administração de 100 ou 200 mg/kg de AO elevou para 34 e 30% a massa pulmonar seca. Os resultados de nosso estudo, possibilitam ainda sugerir que o aumento da permeabilidade vascular é tempo-dependente e diretamente relacionado à provável depuração pulmonar do AO.

Talvez seja pertinente discutir, a essa altura, alguns dos possíveis mecanismos subjacentes à injúria pulmonar causada por AO. Os mecanismos iniciais pelo qual o AO induz *aumento da permeabilidade vascular* são pouco claros. Porém, uma das hipóteses é a lesão endotelial vascular ser devida à *formação de radicais livres*, provenientes da degradação do AO por lipases pulmonares. De forma geral, após lesão tecidual, causada por diferentes fatores químicos, físicos ou biológicos, há ligeira vasoconstrição arteriolar, provavelmente de origem neurogênica, que é seguida de

vasodilatação, aumento de fluxo sangüíneo e conseqüente aumento da pressão hidrostática vascular. Por sua vez, esta última alteração eleva a transudação de fluido com baixo nível protéico. Posteriormente, devido ao somatório da ação de múltiplos mediadores químicos, como também do aumento da pressão intravascular, há dilatação venular pronunciada acompanhada de aumento da permeabilidade vascular, gerando a saída de fluido rico em proteínas (exsudato) para o meio extravascular (para revisões ver **VANE & FERREIRA, 1979; BARNES & LIU, 1995**).

Alguns estudos experimentais permitem sugerir os prováveis mecanismos envolvidos com o aumento da permeabilidade vascular pulmonar causada por AO. Utilizando a fratura bilateral de fêmur de cão, modelo de embolia gordurosa, **SHERR et al. (1974a)** demonstraram que o AO corresponde à cerca de 50 % do teor total de ácidos graxos livres no sangue pulmonar destes animais, enquanto o ácido palmítico representa 21% e os ácidos palmitolêico, esteárico, linolêico e linolênico totalizavam os cerca de 30% restantes. Os autores, mostraram ainda que o AO era o ácido graxo presente em maior concentração nos triglicerídeos presentes no tecido adiposo, hepático e na medula óssea. Estes resultados, fizeram os autores sugerirem que a elevação intrapulmonar de ácidos graxos livres, após embolia gordurosa, sinalizava a existência de lipases pulmonares. A presença de ácidos graxos livres insaturados na circulação pulmonar é muito mais tóxica do que a presença de triglicerídeos, diglicerídeos ou ácidos graxos saturados (**SCHUSTER, 1994**). Por exemplo, a DL₅₀ de AO em coelhos está na ordem de 250 mg/kg, enquanto a de triglicerídeos neutros que não causam lesão pulmonar, como a trioleína, é muito mais elevada (**PELTIER, 1967**). Como outros ácidos graxos insaturados e saturados, o AO possui propriedades

hidrofóbicas e hidrofílicas, ou seja, é um composto anfófilo. Talvez estas características químicas do AO facilitem a sua ligação às membranas do endotélio vascular pulmonar e favoreçam a ação enzimática das lipases pulmonares. Este metabolismo enzimático do AO pelas lipases acarreta a formação de radicais livres oxidantes que parecem contribuir à lesão endotelial, já que o aumento da permeabilidade endotelial capilar induzido pela infusão de AO em lóbulos pulmonares de cão, isolados e perfundidos, é reduzido pelo tratamento prévio com prometazina ou N,N'-difetil-p-fenilenodiamina (**TOWNSLEY et al., 1985**). Outro fator importante, de natureza anátomo/fisiológica, é a extensão da área ocupada pelas células endoteliais no pulmão em relação a outros tecidos, equivalente à área ocupada por 5 quadras de tênis. **BEILMAN (1995)** evidenciou que o AO marcado com carbono 14 (^{14}C -AO) acumula-se preferencialmente nos pulmões, após administração i.v. O acúmulo pulmonar de AO foi 5 vezes maior que o acúmulo intra-hepático, 15 vezes maior que o renal, 24 vezes maior que o plasmático e superior a 110 vezes aquele observado no tecido cerebral. Em vista do exposto, parece plausível que o mecanismo inicial de lesão pulmonar induzido pelo AO seja devido, em parte, à ação de radicais livres. Salienta-se, no entanto, que a lesão pulmonar é favorecida devido a grande área ocupada pelas células endoteliais pulmonares, pelas características anfófilas do AO, pela prevalência de AO no conjunto de triglicerídeos e pela ação, provavelmente específica, de lipases pulmonares.

Outro possível mecanismo envolvido com o aumento da permeabilidade vascular pulmonar, causado pela ação do AO, é a formação de derivados eicosanóides ou de PAF. Os eicosanóides contribuem, além do aumento da permeabilidade vascular, com a

resposta vasoconstritora à hipóxia (PGI_2), recrutamento de neutrófilos (LTB_4 ; TxA_2) e agregação plaquetária [TxA_2] [**CHANG et al., 1987; CHRISTMAR et al., 1990**]. Por outro lado, o PAF desempenha diversas ações potencialmente associadas à lesão pulmonar, como, por exemplo, agregação plaquetária, ativação de neutrófilos, indução da vasoconstrição pulmonar e, provavelmente, lesão direta das células endoteliais (**CHANG et al., 1987**).

No presente estudo, o pré-tratamento de camundongos com meloxicam ou dexametasona, inibiu significativamente o acúmulo intrapulmonar de AE induzido pela administração de AO (100 mg/kg, i.v.). O acúmulo de AE, em camundongos pré-tratados com 5 mg/kg de meloxicam foi significativamente reduzido em 63%, após administração intravenosa de 100 mg/kg de AO. De maneira semelhante, o pré-tratamento com 1 mg/kg de dexametasona reduziu o extravasamento de AE para 76%. O meloxicam é um inibidor preferencial da cicloxigenase do tipo 2, enquanto que a dexametasona, inibe indiretamente a fosfolipase A_2 ao estimular a formação da lipocortina-1, além de promover vários outros efeitos farmacológicos antiinflamatórios (para revisão ver **BARNES, 1997**).

Níveis circulantes aumentados de eicosanóides foram evidenciados após a administração i.v. de AO em várias espécies animais. As concentrações plasmáticas de PGE_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e TxB_2 encontram-se elevadas em coelhos e cães, após a administração de AO (**HAGEMAN et al., 1989; STEPHENSON et al., 1992; KATZ et al., 1987; OLANOFF et al., 1984; TACHMES et al., 1991**). Por outro lado, a participação de derivados eicosanóides na lesão pulmonar induzida por AO, encontra

reforço nos estudos que utilizaram bloqueadores da fosfolipase A₂, de cicloxigenase ou da lipoxigenase. **HOFMAN & EHRHART (1981)** e **BROE** e colaboradores (1981) demonstraram que lobos pulmonares isolados de cão, previamente tratados com metilprednisolona, apresentam menor resposta edematogênica à perfusão com AO. Talvez, conforme conclusões de **HOFMAN & EHRHART (1981)**, o bloqueio, pela metilprednisolona, da formação de derivados eicosanóides previna o aumento da resistência venosa pulmonar, conseqüentemente reduzindo a pressão capilar pulmonar. Em adição, estudo semelhante foi conduzido com lobos isolados de pulmão de cobaia, **SELIG** e colaboradores (1987) demonstraram que o ibuprofeno, bloqueador da cicloxigenase, atenua o aumento da concentração protéica no BAL. Por outro lado, o pré-tratamento de ovelhas com ácido acetilsalicílico bloqueia a liberação de TxB₂, induzido pela administração i.v. de AO e, conseqüentemente ocorre também, diminuição da pressão da artéria pulmonar e da resistência vascular pulmonar (**ROSTAGNO et al., 1990**). Outros estudos apontam para a participação adicional de leucotrienos no aumento da pressão vascular pulmonar causada por AO. Em porcos, o BW755c, inibidor da lipoxigenase, atenua o aumento da permeabilidade vascular (**KRUSE-ELLIOTT et al., 1990**) e, em ratos, há elevação plasmática significativa de leucotrienos após a administração de AO (**BALL et al., 1988**).

Os nossos resultados sugerem que o aumento do acúmulo de AE é mediado, em parte, pela ação de eicosanóides, provenientes da lesão pulmonar induzida pelo AO. Estes resultados estão condizentes com os relatados anteriormente. Além disso, há evidências substanciais que apontam a mediação de eicosanóides ou PAF na SARA humana. No BAL de pacientes com SARA, há elevação significativa de LTD₄

(STEPHENSON *et al.*, 1988; CHANG *et al.*, 1989; MATTHAY *et al.*, 1984), LTC₄ (STEPHENSON *et al.*, 1988) e PAF (MATASUMOTO *et al.*, 1992), como também de LTE₄ na urina (BERNARD *et al.*, 1991). Além disso, outros estudos relataram níveis circulantes aumentados de TxB₂ e 6-ceto-PGF_{1α}, metabólitos estáveis do TxA₂ e PGI₂, respectivamente (DEBY-DUPONT *et al.*, 1987).

Além das evidências experimentais que apontam o envolvimento direto de eicosanóides e PAF no aumento da permeabilidade vascular pulmonar na SARA experimental ou humana, há estudos que também evidenciam a participação de outros mediadores químicos nesta patologia. Entre estes, destacam-se as citocinas e os peptídeos pró-inflamatórios (para maiores detalhes veja a Introdução). Entre os peptídeos biologicamente ativos, destacam-se as ETs, devido às suas ações no trato respiratório e nas patologias a ele correlacionadas.

5.2. MEDIAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA POR ÁCIDO OLÉICO EM CAMUNDONGOS:

O resultados do presente estudo demonstram que as ETs estão envolvidas na mediação da fisiopatologia da lesão pulmonar induzida por AO em camundongos. O acúmulo intrapulmonar de AE foi significativamente reduzido em animais pré-tratados com o antagonista misto para receptores ET_A e ET_B bosentan, ou com os antagonistas seletivos para receptores ET_B Ro-468443 e A-192621. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com os antagonistas seletivos para receptores do tipo ET_A, ABT-627 ou A-127722.5, não modificou o grau de extravasamento vascular de AE. Assim, nossos

resultados sugerem que o aumento da permeabilidade vascular pulmonar em camundongos seja devido, em grande parte, à formação ou acúmulo intrapulmonar de ETs, provenientes da lesão tecidual causado por AO, e ativação de mecanismos controlados por receptores ET_B, mas não por receptores ET_A.

Os resultados experimentais colhidos no presente trabalho reforçam sugestões prévias da mediação endotelinérgica na SARA experimental ou na humana. As ações induzidas pelas ETs no trato respiratório, de certa maneira, assemelham-se a alguns aspectos fisiopatológicos encontrados na SARA, entre os quais o aumento da permeabilidade vascular pulmonar. Em pacientes adultos, acometidos de SARA, a concentração plasmática de ET-1 está significativamente elevada tanto na circulação arterial pulmonar quanto na arterial (**DRUML et al., 1993**) ou venosa sistêmicas (**LANGLEBEN et al., 1993**). Resultados similares também foram detectados recentemente em crianças acometidas de SARA (**DOBYNS et al., 1999**). Além disso, experimentalmente, os níveis plasmáticos de ET-1 estão elevados na artéria pulmonar, aorta e átrio direito de ovelhas submetidas à SARA induzida por lavagem intrapulmonar com salina aquecida (**VROOMEN et al., 2001**). Adicionalmente, em ratos submetidos à administração intravenosa de AO, há elevação significativa de ET-1, tanto no plasma como no BAL (**SIMMET et al., 1992**). Por outro lado, ratos tratados com antisoro à ET-1 e submetidos à lesão pulmonar com AO, ocorre diminuição significativa do edema pulmonar, dos níveis de hipoxemia e do conteúdo protêico e de enzimas proteolíticas no espaço alveolar (**ZHANG et al., 1993**). Em cobaias, a administração intravenosa de ET-1 causa extravasamento protêico nos leitos vasculares da árvore respiratória, coração, trato gastrintestinal e rins (**FILEP et al., 1991; FILEP et al., 1992;**

ZIMMERMAN *et al.*, 1992) ou, quando administrada intratecalmente, também induz elevação da permeabilidade microvascular no pulmão e na árvore respiratória de ratos (**POULAT *et al.*, 1998**). Por outro lado, a administração de ET-1 em cães e ratos eleva o hematócrito, sem alterar o volume urinário, sugerindo que a hemoconcentração seja devida ao extravasamento de albumina vascular (**GOETZ *et al.*, 1988; LÓPEZ-FARRÉ *et al.*, 1989**).

Embora nossos resultados indiquem que, na lesão pulmonar induzida por AO em camundongos, os receptores endotelinérgicos do tipo ET_B estão diretamente implicados no aumento do extravasamento vascular pulmonar, não observamos qualquer influência da administração i.v. de ET-1 ou de agonistas seletivos de receptores ET_B (IRL-1620, BQ-3020 ou SXT-6c) sobre o extravasamento vascular pulmonar. À primeira vista, estes resultados podem parecer inesperados, até certo ponto, devido a estudos prévios demonstrarem que a administração i.v. de ETs pode aumentar a permeabilidade vascular no trato respiratório de rato e cobaia por ativação de receptores do tipo ET_A e/ou ET_B.

Neste sentido, no rato, a infusão de ET-1 aumenta o extravasamento de albumina em diversos órgãos, incluindo a traquéia e brônquios principais, em parte por ativação de receptores do tipo ET_A (**FILEP *et al.*, 1991; ZIMMERMAN *et al.*, 1992; FILEP *et al.*, 1994**). Porém, receptores ET_B também parecem desempenhar papel significativo neste processo, pois a administração i.v. de IRL-1620, agonista seletivo deste tipo de receptor, também eleva o extravasamento de albumina marcada com AE em ratos conscientes, tanto nos brônquios superiores quanto nos inferiores, mas não na

traquéia ou no parênquima pulmonar. Em adição, o pré-tratamento dos animais com BQ-123 ou FR-139317, antagonistas peptídicos seletivos de receptores ET_A, ou também, com bosentan, antagonista misto de receptores ET_A/ET_B, inibem o extravasamento protéico nos brônquios (**FILEP et al., 1993; FILEP et al., 1994**). A exemplo do observado no rato, a infusão i.v. de ET-1 em cobaias também causa aumento da permeabilidade vascular na traquéia e brônquios, mas não em parênquima, sendo que este efeito resulta da ativação de receptores endotelinérgicos dos tipos ET_A e ET_B (**FILEP et al., 1995**). Porém, pelo menos no rato, a infusão de ET-3 no leito microvascular de mesentério isolado acarreta aumento da permeabilidade vascular e constrição arteriolar mediadas exclusivamente por receptores do tipo ET_B (**KUROSE et al., 1993**). O que aponta para diferenças importantes no acoplamento de receptores endotelinérgicos aos mecanismos que deflagram aumentos de permeabilidade em leitos vasculares de diferentes órgãos, tratos e/ou tecidos.

É importante ressaltar, contudo, que nenhum dos estudos mencionados no parágrafo precedente demonstrou aumentos do extravasamento protéico induzidos pela administração i.v. isolada de ET-1 em parênquima, mas sim apenas nas vias aéreas de maior calibre. Assim, a ausência de um efeito significativo da infusão i.v. de ET-1 ou de agonistas seletivos de receptores ET_B sobre o extravasamento de AE em camundongos não chega a ser diferente do que se observa no rato ou cobaia. Contudo, parece pertinente salientar que **FILEP** e colaboradores (**1993**) observaram que a ET-1 causa um nítido aumento do acúmulo de AE em parênquima pulmonar de ratos tratados previamente com um inibidor não seletivo da óxido nítrico-sintase.

Por outro lado, a exemplo do que foi observado no presente estudo, com relação ao aumento de permeabilidade vascular pulmonar causado pelo AO, o extravasamento de AE na cavidade pleural de camundongos induzido pela administração de carragenina também é reduzido pelo bloqueio local de receptores ET_B, mas não dos ET_A, mas a resposta causada pelo zimosan independe da ativação de quaisquer desses receptores (**SAMPAIO et al. 2000**). No pulmão de rato, porém, o aumento de extravasamento de albumina marcada com ⁵¹Crômio ou AE causado por LPS de *E. coli*, outro modelo experimental de lesão pulmonar, é reduzido substancialmente pelo pré-tratamento com antagonistas de receptores ET_A, mas não ET_B (**FILEP, 2000; HELE et al., 2000**).

Os pulmões constituem o principal órgão responsável pela remoção da ET-1 circulante (**ANGAARD et al., 1989**; para revisão ver **BATTISTINI & DENAULT, 1998**). A administração i.v. prévia de um antagonista seletivo de receptor ET_B, mas não de ET_A, reduz a retenção de ¹²⁵I-ET-1 pelo pulmão de rato *in vivo* ou perfundido *in vitro* (**FUKURODA et al., 1994**) e de cão *in vivo* (**DUPUIS et al., 1996**). Deste modo, fica evidente que receptores ET_B situados no leito vascular pulmonar desempenham importante papel na depuração de ET-1 sangüínea. Apesar disso, a ausência de qualquer efeito da administração de ET-1 exógena ou de agonistas seletivos ET_B sobre a permeabilidade vascular pulmonar, visto no presente estudo, sugere que estes receptores ET_B envolvidos na depuração, possivelmente localizados nas células endoteliais, não controlam o extravasamento protêico, pelo menos em condições fisiológicas normais. No entanto, parece plausível vislumbrar que tais receptores possam desempenhar papéis adicionais quando as células endoteliais são expostas a

agentes lesivos como o AO, LPS ou monocrotalina, por exemplo. Por outro lado, há evidências consistentes de que tanto o AO (**SIMMET et al., 1992**), quanto o LPS (**FILEP, 2000**) e a monocrotalina (**DUPUIS et al., 2000**) elevam os níveis circulantes de ET-1, em parte por aumentar a síntese e liberação deste peptídeo pelos pulmões. Em humanos, também há evidências de que pacientes com lesão pulmonar associada à SARA por sepse (**LANGLEBEN et al., 1993**) ou hipertensão pulmonar (um dos sintomas da SARA; **DUPUIS et al., 2000**) apresentam alterações importantes no metabolismo de ET-1, que levam a aumentos da concentração plasmática do peptídeo, seja por aumento da síntese e/ou redução da taxa de depuração pulmonares.

Conforme mencionado na Introdução, diversos tipos celulares presentes no pulmão podem expressar big-ET-1 e sintetizar ET-1, incluindo as células endoteliais vasculares, as células epiteliais que revestem as vias aéreas, pneumócitos do tipo II alveolares, bem como leucócitos (em especial macrófagos, mas não neutrófilos; para revisão ver **BOSCOE et al., 2000**). Com relação aos neutrófilos, é pertinente mencionar que, embora não expressem big-ET-1, podem converter o precursor em ET-1 se apresentados a ele (**SESSA et al., 1992; KAW et al., 1992**). Assim, há múltiplos tipos celulares que poderiam constituir fontes em potencial da ET-1 mobilizada pelo AO para induzir o aumento da permeabilidade vascular pulmonar detectada no presente estudo. Entre estas diversas possibilidades, avaliamos se este aumento de permeabilidade vascular pulmonar estaria correlacionado com a infiltração de *células inflamatórias*. Os leucócitos, principalmente os neutrófilos, induzem aumento da permeabilidade vascular, após lesão de células endoteliais e epiteliais do trato respiratório, devido à síntese de

agentes potencialmente citotóxicos como o ânion superóxido (para revisão ver **WORTHEN & DOWNEY, 1996; WAGNER & ROTH, 2000**).

No presente estudo, a administração i.v. de 100 mg/kg de AO em camundongos causou aumento significativo de células mononucleares (mas não de neutrófilos) nas amostras de BAL, no tempo de 4 h. Com a dose de 200 mg/kg, ocorreu também o aparecimento adicional de neutrófilos. Por outro lado, a análise da atividade da mieloperoxidase não demonstrou a ativação neutrófilos no parênquima pulmonar, após lesão com AO (200 mg/kg).

Estudos clínicos e experimentais tem apresentado evidências circunstanciais envolvendo os leucócitos na mediação da lesão pulmonar aguda. A autópsia de pacientes que vieram a óbito devido à SARA revelou infiltração proeminente de células inflamatórias no pulmão (**LAMY et al., 1976; BACHOFEN et al., 1982; PITTET, 1997**). Além disso, determinadas condições clínicas associadas à ativação intravascular do sistema complemento apresentam seqüestramento/aderência de leucócitos polimorfonucleares ao endotélio do leito vascular pulmonar, com aumento concomitante da permeabilidade vascular (**CRADDOCK et al., 1977; CHENOWETH et al., 1981**). Por outro lado, a análise histológica de pulmão de animais submetidos à lesão, inclusive com AO, revela infiltração leucocitária extravascular, durante a fase exsudativa (**BRIGHAM et al., 1979; TILL et al., 1982; EIERMANN et al., 1983**). Em adição, estudos *in vivo* demonstram que o aumento da permeabilidade pulmonar é atenuado em animais leucopênicos (**STAUB et al., 1981; JOHANSON et al., 1982**).

Estudos experimentais de lesão pulmonar induzido por AO em camundongos, demonstrando a infiltração pulmonar de células inflamatórias, são raros. Os estudos conduzidos por **DEJUN** e colaboradores (1996) ou **HAKKINEN** e colaboradores (1983) demonstram infiltração de células inflamatórias (leucócitos mono e polimorfonucleares) no pulmão de camundongos lesionados com AO, através da análise do BAL ou por histopatologia. No entanto, nestes trabalhos não se discriminou entre as populações de células mono ou polimorfonucleares. Por outro lado, **LOSSOS** e colaboradores (2000) demonstraram que os leucócitos mononucleares perfazem mais de 95% da população de células inflamatórias nas amostras de BAL de camundongos lesionados com bleomicina, agente químico utilizado para a indução de fibrose pulmonar. Estes resultados são similares aos obtidos no presente estudo, onde as células mononucleares constituem a ampla maioria das células inflamatórias presentes no BAL de animais tratados com AO. Torna-se importante ressaltar, ainda, que a infiltração de uma população específica de leucócitos é dependente do agente lesivo. Recentemente, **SAMPAIO** e colaboradores (2000a, 2000b) demonstraram que a administração de distintos agentes pró-inflamatórios na cavidade pleural de camundongos, ou a sensibilização dos animais com ovoalbumina acarreta a infiltração desigual entre leucócitos. A administração intrapleural de carragenina ou zimozan atrai muito mais neutrófilos do que monócitos, enquanto que a administração de LPS ou de ovoalbumina atrai preferencialmente as células mononucleares. Neste sentido, nossos resultados são sugestivos de que a lesão pulmonar induzida por AO em camundongos acarreta maior infiltração de células mononucleares do que neutrófilos. Talvez essa seja a razão

pela qual não foi possível detectarmos aumento significativo dos níveis de mieloperoxidase em pulmões de camundongos tratados com AO.

No presente estudo, o pré-tratamento com bosentan (30 mg/kg), antagonista misto de receptores ET_A/ET_B ou com Ro-468443 (10 mg/kg), antagonista seletivo de receptores ET_B , inibiu significativamente o aumento de neutrófilos no BAL, sem alterarem a infiltração dos mononucleares, nos grupos de animais tratados com 200 mg/kg de AO. Além disso, o pré-tratamento com ABT-627 (5 mg/kg), antagonista seletivo de receptores ET_A , inibiu tanto a infiltração dos leucócitos mononucleares quanto a de neutrófilos nas amostras de BAL. Estes resultados sugerem que a migração de leucócitos mononucleares é regulada pela ativação de receptores endotelinérgicos do tipo ET_A , enquanto que a migração de neutrófilos possa ser estimulada tanto por receptores ET_A quanto ET_B . Nossos resultados foram os primeiros a demonstrarem que há mediação endotelinérgica na infiltração leucocitária em pulmão de camundongos, após lesão com AO.

Parece provável que o aumento da permeabilidade vascular mediado pelas ETs seja devido à co-participação de células inflamatórias. **HELSET** e colaboradores (1993) evidenciaram que o aumento da permeabilidade vascular causado pela infusão de ET-1 no pulmão isolado de rato é dependente da presença de leucócitos. Em adição, a infusão de ET-1 causa retenção (ou seja, seqüestro) de neutrófilos pelo leito pulmonar em ratos (**HELSET et al., 1996; SATO et al., 2000**) e leito coronariano em coelhos (**LOPEZ-FARRE et al., 1993**). Tanto a ativação de receptores do tipo ET_A quanto dos ET_B medeiam a infiltração pulmonar de leucócitos. O seqüestro de neutrófilos na lesão

por isquemia e reperfusão em ratos (**OKADA et al., 1995**) e, também, em camundongos (**FUJITANI et al., 1997**), é inibido por antagonistas de receptores ET_A. Em adição, em camundongos sensibilizados à ovoalbumina, a infiltração de células mononucleares na cavidade pleural estimulada por desafio com este antígeno é inibida pela administração local de BQ-123, antagonista peptídico para receptores ET_A e, não é afetada por BQ-788, antagonista peptídico para receptores do tipo ET_B (**SAMPAIO et al., 2000**). Porém, na pleurisia em camundongos com LPS, a infiltração de neutrófilos ou de células mononucleares foram inibidas por BQ-123 e BQ-788, respectivamente (**SAMPAIO et al., 2000**).

Os resultados histopatológicos obtidos no presente estudo reforçam, em parte, a possível correlação entre o aumento de permeabilidade vascular e a infiltração leucocitária. A administração de AO (200 mg/kg, i.v.) em camundongos causou infiltração leucocitária, hemorragia, congestão vascular e edema intersticial pulmonar, de forma dose-dependente. O infiltrado celular foi reduzido após pré-tratamento com todos os antagonistas utilizados, enquanto que o edema intersticial foi significativamente reduzido (mas não por completo) somente por bosentan (anti ET_A e ET_B) e os antagonistas seletivos ET_B Ro-468443 e A-192621. O processo hemorrágico foi reduzido significativamente com o pré-tratamento com bosentan, A-192621 ou A-127722.5. Por outro lado, somente o A-192621 reduziu a congestão vascular. Estes resultados acumulados, analisados em conjunto, sugerem que tanto a ativação de receptores endotelinérgicos do tipo ET_A quanto os do tipo ET_B estão implicados nos processos fisiopatológicos da SARA experimental induzida com AO em camundongos.

Parece oportuno tecer algumas considerações sobre as possíveis relações entre os efeitos de antagonistas de receptores ET_A e/ou ET_B sobre as alterações da permeabilidade vascular, do acúmulo de leucócitos no BAL e dos índices histopatológicos provenientes da lesão pulmonar causada pelo AO. O bloqueio de receptores ET_B por antagonistas seletivos (Ro-468443 ou A-192621) ou por antagonista misto (bosentan) resulta na diminuição da permeabilidade vascular e da infiltração de neutrófilos, mas não de células mononucleares, no BAL de camundongos lesionados com AO. Por outro lado, o bloqueio seletivo apenas de receptores ET_A (pelos antagonistas ABT-627 ou A-127721.5) não causa diminuição da permeabilidade vascular, mas é capaz de inibir o acúmulo tanto de neutrófilos quanto de leucócitos mononucleares no BAL de camundongos expostos ao AO. À primeira vista, deveria parecer coerente que o bloqueio dos receptores ET_A e ET_B pelo bosentan resultasse na inibição de leucócitos mononucleares no BAL de camundongos lesionados com AO, como visto após antagonismo dos receptores ET_A com ABT-627. Porém, em nosso estudo, esta resposta não ocorreu. Os resultados obtidos sugerem uma possível interação funcional entre neutrófilos e leucócitos mononucleares quanto à resposta permeante vascular induzida por AO em pulmões de camundongos. A diminuição concomitante de neutrófilos e células mononucleares no BAL de camundongos submetidos à lesão pulmonar com AO, após pré-tratamento com antagonista seletivo de receptores ET_A , não se faz acompanhar de diminuição da permeabilidade vascular. Porém, quando há diminuição da infiltração de neutrófilos, mas não de células mononucleares, o aumento da permeabilidade vascular torna-se suscetível ao bloqueio seletivo de receptores ET_B , ou simultâneo de receptores ET_A e ET_B . Talvez a interação

entre células leucocitárias mono e polimorfonucleares, na lesão pulmonar induzida por AO, resulta na ativação de mecanismos e/ou mediadores envolvidos nos processos de regulação intrapulmonares no controle da resposta inflamatória. Em vista do exposto e, também, da complexidade da estruturação da fisiopatológica da SARA experimental induzida por AO, torna-se imperativo a condução de novos experimentos, para esclarecer por quais mecanismos implicam as ETs nesta síndrome, tanto em humanos quanto em modelos animais.

A lesão pulmonar induzida por AO em camundongos causa, conforme nossos resultados, reforçado por estudos prévios, a síntese de ETs e, estas medeiam processos de extravasamento vascular e migração leucocitária, como sumarizados na **FIGURA 24**. Os estudos experimentais que apontam a participação das ETs na fisiopatologia da SARA, ainda são escassos. O bloqueio do aumento da permeabilidade vascular e da migração de células inflamatórias, como também, a diminuição do processo lesivo causado pelo AO, por antagonistas endotelinérgicos em camundongos, permite-nos sugerir uma nova intervenção farmacológica na SARA. Além disso, contribui, também, com novas abordagens a serem utilizadas com o modelo experimental de SARA induzida com AO.

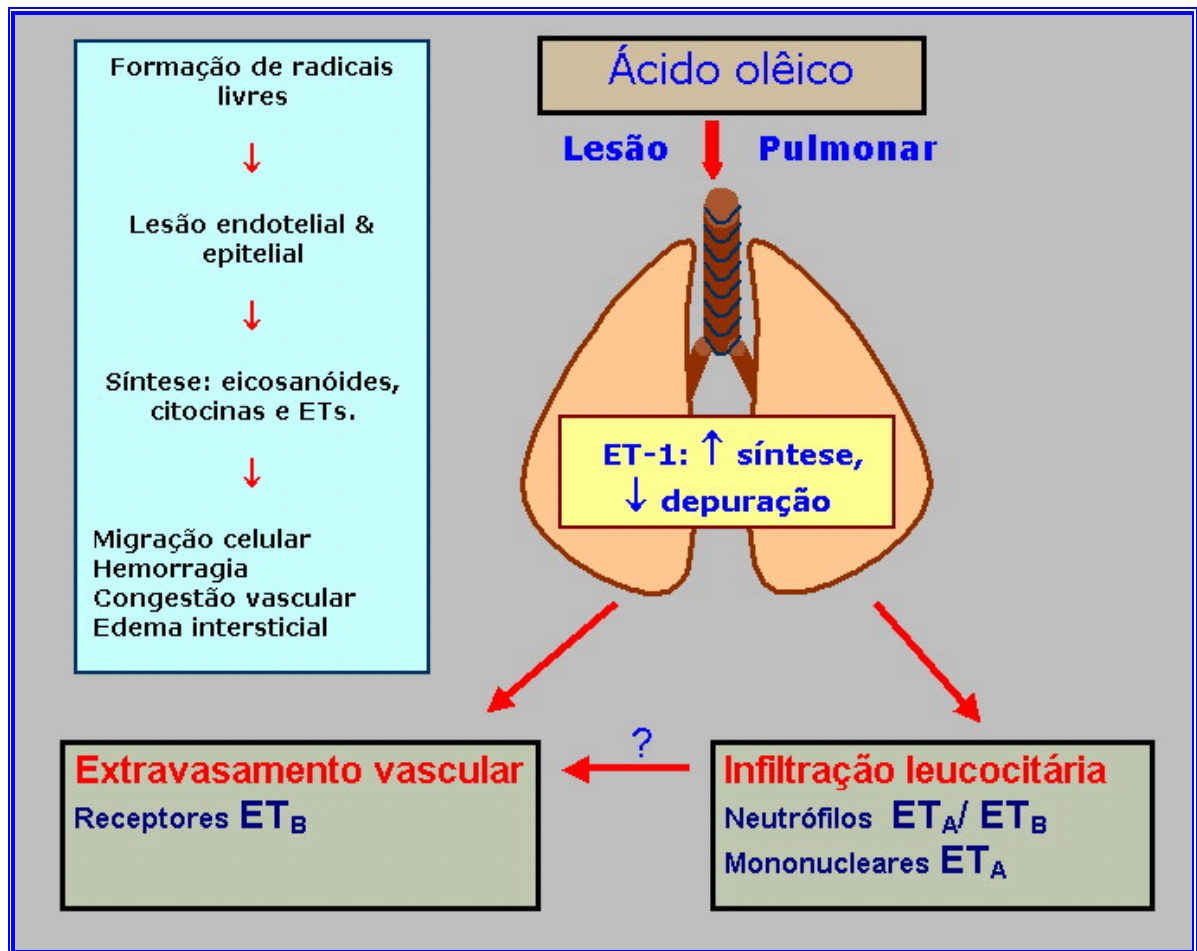


Figura 24 – Diagrama ilustrativo da mediação endotelínérgica na SARA experimental induzida por ácido oléico em camundongos. O ácido oléico induz a formação de radicais livres e, estes lesam as células endoteliais e epiteliais. A lesão celular e tecidual acarreta na síntese e diminuição da depuração de endotelinas. As ETs, medeiam, pelo menos, o aumento da permeabilidade vascular, através dos receptores ET_B e, a migração de leucócitos através da ativação dos receptores ET_A e ET_B. Talvez, a infiltração leucocitária influencie nos processos de permeabilidade vascular pulmonar.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem-nos concluir que:

- A administração endovenosa de AO em camundongos induz um aumento da permeabilidade vascular pulmonar, que é dependente da dose e acompanhada o aumento gradativo da massa pulmonar seca, bem como um aumento menos pronunciado da permeabilidade do leito vascular do intestino delgado, mas não do rim.
- Os aumentos do acúmulo intrapulmonar de azul de Evans e da massa tecidual seca persistem até, pelo menos, 24 h após a administração endovenosa de AO, embora a janela temporal para o extravasamento aumentado do corante ocorra apenas entre os primeiros 5 a 45 min subseqüentes à injeção.
- Provavelmente, a via da cicloxigenase bem como mecanismos sensíveis à inibição por glicocorticóides estão implicados no aumento da permeabilidade vascular pulmonar induzida por AO em camundongos, devido ao bloqueio da resposta por meloxicam e/ou dexametasona.
- O efeito permeante pulmonar do AO depende da mobilização de endotelinas e da ativação de processos celulares sinalizados através de receptores endotelinérgicos do tipo ET_B, mas não do tipo ET_A.
- A administração exógena de endotelina-1 ou de agonistas seletivos de receptores ET_B (sarafotoxina-6c, IR-1620, BQ-3020) não altera a permeabilidade vascular pulmonar em camundongos.

- A injeção intravenosa de AO causa infiltração pulmonar de leucócitos mono- e polimorfonucleares, que se acumulam no BAL de modo dependente da dose administrada.
- O acúmulo de leucócitos mononucleares no BAL induzido pelo AO é mediado, em parte, por mecanismos que dependem da ativação de receptores endotelinérgicos do tipo ET_A, mas não do tipo ET_B.
- Em contraste, o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares no BAL induzido pelo AO em camundongos é mediada por mecanismos que podem ser deflagrados por ativação de ambos os tipos de receptores endotelinérgicos (ET_A e ET_B).
- A administração prévia de antagonistas de receptores endotelinérgicos dos tipos ET_A e ET_B reduz a gravidade do infiltrado leucocitário e hemorragia pulmonar e, da infiltração leucocitária, hemorragia, congestão vascular e edema intersticial, respectivamente, induzidos por AO.
- Pulmões de camundongos tratados com bosentan, antes da administração do AO, revelaram inibições significativas do infiltrado leucocitário e da hemorragia pulmonar, indicando que tanto receptores ET_A quanto ET_B podem mediar diferentes aspectos da lesão pulmonar causada por AO nesta espécie.
- A lesão pulmonar aguda causada por AO em camundongos depende da ativação do sistema das endotelinas e deflagração de processos celulares que envolvem receptores do tipo ET_A e/ou ET_B, mas que permanecem a ser melhor esclarecidos.

- ANGGARD E, GALTON S, RAE GA, THOMAS R, McLOUGHLIN L, De NUCCI G & VANE JR. The fate of radioiodinated endothelin-1 and endothelin-3 in the rat. **J Cardiovasc Pharmacol 13 (Suppl. 5): S46-S49, 1989.**
- AOKI T, KOJIMA T, ONO A, UNISHI G, **J Cardiovasc Pharmacol 13 (Suppl. 5): S46-S49, 1989.** YOSHIJIMA S, KAMEDA-HAYASHI N, YAMAMOTO C, HIRATA Y & KOBAYASHI Y. Circulating endothelin-1 levels in patients with bronchial asthma. **Ann Allergy 73: 365-9, 1994.**
- ASHBAUGH DG & UZAWA T. Respiratory and hemodynamic changes after injection of free fatty acids. **J Surgical Research 8(9): 417-23, 1968.**
- ASHBAUGH DG, BIGELOW DB, PETTY TL & LEVINE BE. Acute respiratory distress in adults. **Lancet 2: 319-23, 1967.**
- BACHOFEN M & WEIBEL ER. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. **Clin Chest Med 3(1): 35-56, 1982.**
- BAKRIS GL, FAIRBANKS R & TRAISH M. Arginine vasopressin stimulates human mesengial cell production of endothelin. **J Clin Invest 87: 1158-64, 1991.**
- BALL HA, COOK JA, SPICER KM, WISE WC & HALUSHKA PV. Essential fatty acid-deficient rats are resistant to oleic acid-induced pulmonary injury. **J Appl Physiol 67(2): 811-6, 1989.**
- BALL HA, COOK JA, SPICER MK, HSU CY & HALUSHKA PV. Oleic acid-induced pulmonary injury in rats: potential role of sulfidopeptide leukotrienes. **Circulatory Shock 26: 59-70, 1988.**
- BARNES PJ. Molecular mechanisms of glucocorticoid action in asthma. **Pulm Pharmacol Ther 10(1): 3-19, 1997.**
- BARNES PT & LIU SF. Regulation of pulmonary vascular tone. **Pharmacol Rev 47: 87-131, 1995.**
- BATTISTINI B & DUSSAULT P. Biosynthesis, distribution and metabolism of endothelins in the pulmonary system. **Pulm Pharmacol Ther 11(2-3): 79-88, 1998b.**
- BATTISTINI B & DUSSAULT P. Blocking of the endothelin system: the development of receptor antagonists. **Pulm Pharmacol Ther 11(2-3): 97-112, 1998a.**
- BATTISTINI B, D'OLÉANS-JUSTE P & SIROIS P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. **Lab Inves 68:600-28, 1993.**

- BECKER A, DOWDLE EB, HECHLER U, KAUSER K, SONNER P & SCHLEUNING WD. Bibrotoxin, a novel member of the endothelin-sarafotoxin peptide family, from the venom of the burrowing asp *Atractaspis bibroni*. **FEBS Lett** **315: 100-3, 1993**.
- BEILMAN G. Pathogenesis of oleic acid-induced lung injury in rat: distribution of oleic acid during injury and early endothelial cell changes. **Lipids** **30: 817-23, 1995**.
- BERNARD GR, ARTIGAS A, BRIGHAM KL, CARLET J, FALKE K, HUDSON L, LAMY M, LEGALL JG, MORRIS A, SPRAC & and the Consensus Committee. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Care Med** **149: 818-24, 1994**.
- BERNARD GR, KORLEY V CHEE P, SWINDELL B, FORD-HUTCHINSON AW & TAGARI P. Persistent generation of peptide leukotrienes in patients with adult respiratory syndrome. **Am Rev Respir Dis** **144(2): 263-7, 1991**.
- BERNARD GR, WHEELER AP, RUSSELL JA, SCHEIN R, SUMMER WR, STEINBERG KP, FULKERSON WJ, WRIGHT PE, CHRISTMAN BW DUPPONT WD, HIGGINS SB & SWINDELL BB. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The ibuprofen in sepsis study group. **N Engl J med** **336(13): 912-8, 1997**.
- BIHARI DJ & TINKER J. The therapeutic value of vasodilator prostaglandins in multiple organ failure associated with sepsis. **Intensive Care Med** **15(1): 2-7, 1988**.
- BLOCH DK, HONG CC, EDY RL, SHOWS TW & QUERTERMOUST T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene-vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. **Genomics** **10: 236-42, 1991**.
- BLOCH KD, EDDY RL, SHOWS TB & QUETERMOUS T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. **J Biol Chem** **264:1856-61, 1989**.
- BOLLINGER C, FOURIE P & COETZEE A. The effect of prostaglandin E₁ on acute pulmonary artery hypertension during oleic acid-induced respiratory dysfunction. **Chest** **99: 1501-6, 1991**.

- BONE RC, SLOTMAN G, MAUNDER R. Randomised double blind, multicenter study of prostaglandin E1 in patients with the adult respiratory distress syndrome. Prostaglandin E1 study group. **Chest** **96**: 114-9, 1989.
- BOSCOE JM, GOODWIN AT, AMRANI M & YACCOUB MH. Endothelins and the lung. **Inter J Biochem Cell Biol** **32**: 41-62, 2000.
- BRIGHAM K, BOWERS R & HAYNES J. Increased sheep lung vascular permeability caused by *E. Coli* endotoxin. **Circ Res** **45**: 292-7, 1979.
- BROE PJ, TOUNG TJ, MARGOLIS S, PERMUTT S & CAMERON JL. Pulmonary injury caused by free acid: evaluation of steroid and albumin therapy. **Surgery** **89(5)**: 582-7, 1981.
- BROWN CD, BARNES K & TURNER AJ. Anti-peptide antibodies specific to rat endothelin-converting enzyme-1 isoforms reveal isoform localisation and expression. **FEBS Lett** **424**: 183-7, 1998.
- BUTLER RR & SPICER KM. Indomethacin and dexamethasone decrease oleic acid-induced pulmonary protein leak in rabbits. **Circulatory Shock** **20**: 217-29, 1986.
- CARDEN DL, ALEXANDER JS & GEORGE RB. The pathophysiology of the acute respiratory distress syndrome. **Pathophysiology** **5**: 1-13, 1998.
- CARR MJ, GOLDIE RG & HENRY PJ. Influence of respiratory tract viral infection of endothelin-1-induced potentiation of cholinergic nerve-mediated contraction in mouse isolated trachea. **Br J Pharmacol** **119**: 891-8, 1996.
- CASEY ML, WORD RA & MAdDONALD PC. Endothelin-1 gene expression and regulation of endothelin mRNA and protein biosynthesis in vascular human amnion. **J Biol Chem** **266**: 5762-8, 1991.
- CHANG H, WU GJ, WANG SM & HUNG CR. Plasma endothelin levels and surgically correctable pulmonary hypertension. **Ann Thorac Surg** **55(2)**: 450-8, 1993.
- CHANG S, FEDDERSON CO, HENSON PM & VOEKEL NF. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. **J Clin Invest** **79**: 1498-107, 1987.
- CHANG SW, WESTCOTT JY, PICKETT WC, MURPHY RC & VOELKEL NF. Endotoxin-induced lung injury in rats: role of eicosanoids. **J Appl Physiol** **66(5)**: 2407-18, 1989.

- CHENOWETH DE, COOPER SW, HUGLI TE, STEWART RW, BLACKSTONE EH & KIRKLIN JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass. ***N Engl J Med* 304: 497-503, 1981.**
- CHRISTIMAR BW, LEFFERTS PL, BLAIR IA & SNAPPER JR. Effect of platelet activating factor receptor antagonism on endotoxin-induced lung dysfunction in awake sheep. ***Am Rev Respir Dis* 142: 1272-8, 1990.**
- CLOZEL M & ROUX S. La pharmacologie de l'endothéline et de son antagoniste bosentan. ***Annales d'Endocrinologie* 61(1): 75-9, 2000.**
- COCKS TM, MALTA E, KING SJ, WOODS RL & ANGUS JA. Oxyhaemoglobin increases the production of endothelin-1 by endothelial cells in culture. ***Eur J Pharmacol* 196: 177-82, 1991.**
- CRADDOCK PR, FEHR J, DALMASSO AP, BRIGHAM KL & JACOB HS. Hemodialysis leukopenia: pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. ***J Clin Invest* 59: 878-88, 1977.**
- CRAWLEY DE, LIU SF, BARNES PJ & EVANS TW. Endothelin-3 is a potent pulmonary vasodilator in the rat. ***A Appl Physiol* 72(4): 1425-31, 1992.**
- CUZZOCREA S, SAUTEBIN L, De-SARRO G, COSTANTINO G, ROMBOLÀ L, MAZZON E, EALENTI A, De-SARRO A, CILIBERTO G, Di-ROSA M, CAPUTI AP & THIEMERMANN C. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carragenan. ***J Immunol* 163: 5094-104, 1999.**
- D'ORLEANS-JUSTE P, TELEMAQUE S, CLAING A, IHARA M & YANOI M. Human big endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET-1 receptors in the rat perfused lung. ***Br J Pharmacol* 105: 773-5, 1992.**
- De VROOMEN M, LOPES CARDOZO RH, STEENDIJK P, FROLICH M, BAAN J & van BEL F. Endothelin-1 plasma concentration increases in the early phase of pulmonary hypertension development during respiratory distress syndrome: a study in newborn lambs. ***Early Hum* 63(1): 9-21, 2001.**
- DEBY-DUPONT G, BRAUN M, LAMY M DEBY C, PINCEMAIL J, FAYMONVILLE ME, DAMAS P, BODSON L, LECART MP & GOUTIER R. Thromboxane and prostacyclin release in adult respiratory distress syndrome. ***Intensive Care Med* 13(3): 167-74, 1987.**

- DEJUN S, MINGWU Z, DALONG M, SONGLIN L & CHUNHUI D. Protective effect of interleukin-1 receptor antagonist on oleic acid-induced lung injury. ***Chin Med J* 109(7): 522-6, 1996.**
- De-NUCCI G, THOMAS R, D'ORLEANS-JUSTE P, ANTUNES E, WALTER C, WARNER TD & VANE JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. ***Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9797-9800, 1988.**
- DERKS CM & JACOBOWITZ-DERKS D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid. ***Am J Pathol* 87: 143-158, 1977.**
- DOBYNS EL, EELLS PL, GRIEBEL JL & ABMAN SH. Elevated plasma endothelin-1 and cytokine levels in children with severe acute respiratory distress syndrome. ***J Pediatr* 135(2 Pt 1): 246-9, 1999.**
- DRUML W, STELTZER H, WALDHÄUSL, LENZ K, HAMMERLE A, VIERHAPPER H, GASIC S & WAGNER OF. Endothelin-1 in Adult Respiratory Distress Syndrome. ***Am Rev Respir Dis* 148: 1169-73, 1993.**
- DUPUIS J, GORESKY CA & FOURNIER A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs *in vivo*: exclusive role of ET_B receptors. ***J Appl Physiol* 8: 1510-15, 1996.**
- DUPUIS J, JASMIN JF, PRIE S, CERNACEK P. Importance of local production of endothelin-1 and of the ET_B receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. ***Pulm Pharmacol Ther* 13(3): 135-40, 2000.**
- DYSON MC & KADOWITZ PJ. Analysis of responses to endothelin 1, 2 and 3 and sarafotoxin 6b in airways of the cat. ***J Appl Physiol* 71(1): 243-51, 1991.**
- EGGER D, GEUENICH S, DENZLINGER C, SCHMITT E, MAILHAMMER R, EHRENREICH H, DORMER P & HUTNER L. IL-4 renders mast cells functionally responsive to endothelin-1. ***J Immunol* 154(4): 1830-7, 1995.**
- EHREINREICH H, ANDERSON RW, FOX CH, RIECKMAN P, HOFFMAN GS, TRAVIS WD, COLIGAN JE, KEHRL JH & FAUCI AS. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties are produced by human macrophages. ***J Exp Med* 172: 1741-8, 1990.**

- EIERMANN GJ, DICKEY BF & THRALL RS. Polymorphonuclear leukocyte participation in acute oleic acid-induced lung injury. ***Am Rev Respir Dis* 128: 845-50, 1983.**
- ENDO T, UCHIDA Y, MATSUMOTO H, SUZUKI N, NOMURA A, HIRATA F & HASEGAWA S. Regulation of endothelin-1 synthesis in cultured guinea pig airway epithelial cells by various cytokines. ***Biochem Biophys Res Commun* 186: 1594-99, 1992.**
- EVANS TW & HASLETT C, Eds. ARDS: Acute Respiratory Distress in Adults. London: Chapman & Hall Medical, **1996.**
- FERNANDES LB, HENRY PJ & GOLDIE RG. Endothelin-1 potentiates cholinergic nerve-mediated contraction in human isolated bronchus. ***Eur Respir J* 14: 439-42, 1999.**
- FERNANDES LB, HENRY PJ, RIGBY PJ & GOLDIE RG. Endothelin (ET_B) receptor-activated potentiation of cholinergic nerve-mediated contraction in human bronchus. ***BR J Pharmacol* 118(8): 1873-4, 1996.**
- FERNANDEZ-PATRON C, RADOMSKI MW & DAVIDGE ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. ***Circ Res* 85: 906-11, 1999.**
- FILEP JG, BATTISTINI B & SIROIS P. Endothelin induces thromboxane release and contraction of isolated guinea-pig airways. ***Life Sci* 47: 1845-50, 1990.**
- FILEP JG, BATTISTINI B & SIROIS P. Pharmacological modulation of endothelin-induced contraction of guinea pig isolated airways and thromboxane release. ***Br J Pharmacol* 103: 1633-40, 1991a.**
- FILEP JG, CLOZEL M, FOURNIER A & FILEP-FÖLDES E. Characterization of receptors mediating vascular responses to endothelin-1 in the conscious rat. ***Br J Pharmacol* 113: 845-52, 1994.**
- FILEP JG, FOLDES-FILEP E, ROUSSEAU A, SIROIS P & FOURNIER A. Vascular responses to endothelin-1 following inhibition of nitric oxide synthesis in the conscious rat. ***Br J Pharmacol* 110(3): 1213-21, 1993.**
- FILEP JG, FOURNIER A & FOLDES-FILEP E. Acute pro-inflammatory actions of endothelin-1 in the guinea-pig lung: involvement of ET_A and ET_B receptors. ***Br J Pharmacol* 115(2) 227-36, 1995.**

- FILEP JG, SIROIS P, ROUSSEAU A, FOURNIER A, SIROIS P. Effects of endothelin-1 on vascular permeability in the conscious rat: interaction with platelet-activating factor. **Br J Pharmacol** 104: 797-804, 1991b.
- FILEP JG. Endogenous endothelin modulates blood pressure, plasma volume, and albumin escape after systemic nitric oxide blockade. **Hypertension** 30 [part 1]: 22-8, 1997.
- FILEP JG. Endothelin peptides: biological actions and pathophysiological significance in the lung. **Life Sci** 52: 119-33, 1993.
- FILEP JG. Role for endogenous endothelin in the regulation of plasma volume and albumin escape during endotoxin shock in conscious rats. **Br J Pharmacol** 129: 975-83, 2000.
- FINK A, GEVA D, ZUNG A, KONICHEZKY S, ELITRAZ A & BENTWICH Z. Adult respiratory distress syndrome: roles of leukotriene-C₄ and platelet-activating factor. **Crit Care Med** 18: 905-12, 1990.
- FISHMAN AP, Ed. Diagnóstico das Doenças Pulmonares. São Paulo: Editora Manole, Vol. 1, 1992.
- FRANCO-CERECEDA A, MATRAN R, LOU Y-P & LUNDBERG JM. Occurrence and effects of endothelin in guinea-pig cardiopulmonary tissue. **Acta Physiol Scand** 138:539-47, 1990.
- FRANK L & ROBERTS RJ. Endotoxin protection against oxygen-induced acute and chronic lung injury. **J Appl Physiol.: Respirat Environ Exercise Physiol** 47(3): 577-81, 1979.
- FRATACCI MD, FROSTELL CG, CHEN TY, WAIN JC JR, ROBINSON DR & ZAPOL WM. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator of heparin-protamine vasoconstriction in sheep. **Anesthesiology** 75(6): 990-9, 1991.
- FROSTELL C, FRATACCI MD, WAIN JC, JONES R & ZAPOL WM. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Circulation** 83: 2038-47, 1991.
- FROSTELL CG, BLOMQVIST H, HEDENSTIERNA G, LUNDBERG J & ZAPOL WM. Inhaled oxide nitric selectively reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. **Anesthesiology** 78: 427-35, 1993.

- FUJITANI Y, TRIFILIEFF A, TSUYUKI S, COYLE AJ & BERTRAND C. Endothelin receptor antagonists inhibit antigen-induced lung inflammation in mice. ***Am J Respir Crit Care Med* 155(6): 1890-4, 1997.**
- FUKURODA T, FUJIKAWA T, OZAKI S, ISHIKAWA K, YANO M & NISHIKIBE M. Clearance of circulating endothelin-1 by ET_B receptors in rats. ***Biochem Biophys Res Commun* 199: 1461-5, 1994a.**
- FUKURODA T, KOBAYASHI M, OZAKI S, YANO M, MIYAUCHI T, ONIZUKA M, SUGISHITA Y, GOTO K & NISHIKIBE M. Endothelin receptor subtypes in human versus rabbit pulmonary arteries. ***J Appl Physiol* 76: 1976-82, 1994b.**
- FURUKAWA K, SALEH D, BAYAN F, EMOTO N, KAW S, YANAGISAWA M & GIAID A. Co-expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in patients with chronic rhinitis. ***Am J Respir Cell Mol Biol* 14: 248-53, 1996.**
- GALILI Y, BEN-ABRAHAM R, WEINBROUM A, MARMUR S, IAINA A, VOLMAN Y, PEER G, SZOLD O, SOFFER D, KLAUSNER J, RABAU M & KLUGER Y. Methylene blue prevents pulmonary injury after intestinal ischemia-reperfusion. ***J Trauma* 45(2): 222-6, 1998.**
- GARCIA-LEME J. Hormones and Inflammation. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989.
- GIAID A, HAMID QA, SPRINGALL DR, YANAGISAWA M, SHINMI O, SAWAMURA T, MASAKI T, KIMURA S, CORRIN B, POLAK JM. Detection of endothelin immunoreactivity and mRNA in pulmonary tumours. ***J Pathol* 162: 15-22, 1990.**
- GIAID A, MICHEL RP, STEWART DJ, SHEPPARD M, CORRIN B & HAMID Q. Expression of endothelin-1 in lung of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. ***Lancet* 341: 1550-54, 1993a.**
- GIAID A, STEWART DJ & MICHEL RP. Endothelin-1-like immunoreactivity in postobstructive pulmonary vasculopathy. ***J Vasc Res* 30: 333-38, 1993b.**
- GIAID A, YANAGISAWA M, LANGLEBEN D, MICHEL RP, LEVY R, SHENNIB H, KIMURA S, MASAKI T, DUGUID WP & STEWART DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. ***N Engl J Med* 328:1732-39, 1993c.**
- GIRI SN, HOLLINGER MA & SCHIEDT MJ. The effects of paraquat and superoxide dismutase on pulmonary vascular permeability and edema in mice. ***Archives of Environmental Health* 36(4): 149-54, 1981.**

- GLASSBERG MK, ERGUL A, WANNER A & PUETT D. Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. ***Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 316-21, 1994.**
- GOETZ KL, WANG BC, MADWED JB, ZHU JL & LEADLY-Jr RJ. Cardiovascular, renal and endocrine responses to intravenous endothelin in the conscious dog. ***Am J Physiol* 255: R1064-R1068, 1988.**
- GOLDIE RG & FERNANDES LB. A possible mediator role for endothelin-1 in respiratory disease. ***Monaldi Arch Chest Dis* 55: 162-7, 2000.**
- GOLDIE RG, HENRY PJ, KNOTT PG, SELF GJ, LUTTMANN MA & HAY DWP. Endothelin-1 receptor density, distribution and function in human isolated asthmatic airways. ***Am J Respir Crit Care Med* 152: 1653-8, 1996.**
- GOLDIE RG. Endothelin receptor subtypes: distribution and function in the lung. ***Pulm Pharmacol Ther* 11: 89-95, 1998.**
- GRUNSTEIN MM, CHUANG ST, SCHRAMM CM & PAWLOWSKI NA. Role of endothelin-1 in regulation rabbit airway contractility. ***Am J Physiol* 260(2 Pt 1): L75-82, 1991.**
- HAGEMAN JR, McCULLOCH K, HUNT CE, COBB M, QUADE B, CRUSSI F & PACHMAN L. Oleic acid lung injury increases plasma prostaglandin levels. ***Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 35(3): 157-64, 1989.**
- HAKKINEN PJ, MORSE CC, MARTIN FM, DALBEY WE, HASCHER WM & WITSCHI HR. Potentiating effects of oxygen in lungs damaged by methylcyclopentadienyl-manganese tricarbonyl, cadmium chloride, oleic acid and antitumor drugs. ***Toxicol Appl Pharmacol* 67(1): 55-69, 1983.**
- HASLETT C. Mechanisms of resolution of lung inflammation. In.: Evans TW & Haslett C, Eds. ARDS: Acute Respiratory Distress in Adults. London: Chapman & Hall Medical, **1996.**
- HASUNUMA K, RODMAN DM, O'BRIEN RF & McMURTRY IF. Endothelin-1 causes pulmonary vasodilation in rats. ***Am J Physiol* 259(1 Pt 2): H48-54, 1990.**
- HAY DWP, HUBBARD WC & UNDEM BJ. Endothelin-induced contraction and mediator release in human bronchus. ***Br J Pharmacol* 110: 392-8, 1993.**
- HELE DJ, BIRREL MA, WEBBER SE, FOSTER ML & BELVISE MG. Effects of endothelins antagonists, including the novel ET_A receptor antagonist LBL 031,

- on endothelin-1 and lipopolysaccharide-induced microvascular leakage in rat airways. ***Br J Pharmacol* 131(6): 1129-34, 2000.**
- HELSET E, KJAEVE J & HAUGE A. Endothelin-1-induced increases in microvascular permeability in isolated, perfused rat lungs requires leukocytes and plasma. ***Circulatory Shock* 39: 15-20, 1993.**
- HELSET E, LINDAL S, OLSEN R, MYKLEBUST R & JORGENSEN L. Endothelin-1 causes sequential trapping of platelets and neutrophils in pulmonary microcirculation in rats. ***Am J Physiol* 271(4 Pt 1): L538-46, 1996.**
- HEMSEN A, FRANCO-CERECEDA A, MATRAN R, RUDEHILL A & LUNDBERG JM. Occurrence, specific binding sites and functional effects of endothelin in human cardiopulmonary tissue. ***Eur J Pharmacol* 191:319-28, 1990.**
- HEMSEN A, LARSEN O & LUNDBERG JM. Characteristics of endothelin A and B binding sites and their vascular effects in pig peripheral tissues. ***Eur J Pharmacol* 208: 313-22, 1991.**
- HENRY PJ & GOLDIE RG. Potentiation by endothelin-1 of cholinergic nerve-mediated contractions in mouse trachea via activation of ET_B receptors. ***Br J Pharmacol* 114: 563-69, 1995.**
- HENRY PJ, RIGBY PJ, SELF GJ, PREUSS JM & GOLDIE RG. Relationship between endothelin-1 binding site densities and constrictor activities in human and animal airway smooth muscle. ***Br J Pharmacol* 100: 786-92, 1990.**
- HENRY PJ, SHEN A, MITCHELSON F & GOLDIE RG. Inhibition by endothelin-1 of cholinergic nerve-mediated acetylcholine release and contraction in sheep isolated trachea. ***Br J Pharmacol* 118(3): 762-8, 1996.**
- HERBST C, TIPPLER B, SHAMS H & SIMMET Th. A role for endothelin in bicuculline-induced neurogenic pulmonary oedema in rats. ***Br J Pharmacol* 115: 753-60, 1995.**
- HORGAN MJ, PINHEIRO JBM & MALIK AB. Mechanism of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction. ***Circ Res* 69: 157-64, 1991.**
- INOUE A, YANAGISAWA M, TAKUWA Y, MITSUI Y, KOBAYASHI M & MASAKI T. The human preproendothelin-1 gene. ***J Biol Chem* 264: 14954-59, 1989.**
- ISKIT AB & GUC MO. The timing of endothelin and nitric oxide inhibition effects survival in a mice model of septic shock. ***Eur J Pharmacol* 414: 281-7, 2001.**

- JACKSON JH, WHITE CW, PARKER NB, RYAN JW & REPINE JE. Dimethylthiourea consumption reflects H₂O₂ concentrations and severity of acute lung injury. **J Appl Physiol** 59(6): 1995-8, 1985.
- JEFFERSON NC & NECHELES H. Oleic acid toxicity and fat embolism. **Proc Soc Exp Biol** 248-50, 1948.
- JOHANSON A & MALIK AB. Pulmonary edema after glass bead microembolization: protective effect of granulocytopenia. **J Appl Physiol** 52: 155-61, 1982.
- JOHANSON WG, HOLCOMB JR & COALSON JJ. Experimental diffuse alveolar damage in baboons. **Am Rev Respir Dis** 126: 142-51, 1982.
- JONES JG, MINTY BD, BEELEY JM, ROYSTON D, CROW J & GROSSMAN RF. Pulmonary epithelial permeability is immediately increased after embolisation with oleic acid but not with neutral fat. **Thorax** 37(3): 169-74, 1982.
- KAISERS U, BUSCH T, WOLF S, LOHBRUNNER H, WILKENS K, HOCHER B & BOEMKE W. Inhaled endothelin A antagonist improves arterial oxygenation in experimental acute lung injury. **Intensive Care Med** 26: 1334-42, 2000.
- KANSE SM, TAKAHASHI K, LAM H-C, RESS A, WARREN JB, PORTA M, MOLINATTI P, GHATEI M & BLOOM SR. Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. **Life Sci** 48: 1379-84, 1991.
- KATZ SA, HALUSHKA PV, WISE WC & COOK JA. Oleic acid induces pulmonary injury independent of eicosanoids in the isolated, perfused rabbit lung. **Circ Schok** 22(3): 221-30, 1987.
- KAW S, HECKER M & VANE JR. The two-step conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 and degradation of endothelin-1 by subcellular fractions from human polymorphonuclear leukocytes. **Proc Natl Acad Sci** 89(15): 6886-90, 1992.
- KEDZIERSKI RM & YANAGISAWA M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 41: 851-76, 2001.
- KHIMENKO PL, MOORE TM & TAYLOR AE. Blocked ETA receptors prevent ischemia and reperfusion injury in rat lungs. **J Appl Physiol** 80(1): 203-7, 1996.
- KITAMURA K, TANAKA T, KATO J, ETO T & TANAKA K. Chromatographic characterization of immunoreactive endothelin in rat lung. **Life Sci** 46:405-9, 1990a.

- KITAMURA K, TANAKA T, KATO J, ETO T & TANAKA K. Regional distribution of immunoreactive in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. ***Biochem Biophys Res Commun* 161:348-52, 1989.**
- KITAMURA K, YUKAWA T, MORITA S, ICHIKI Y, ETO T & TANAKA K. Distribution and molecular form of immunoreactive big endothelin-1 in porcine tissue. ***Biochem Biophys Res Commun* 170:497-503, 1990b.**
- KLOOK Y, AMBAR I, SOKOLOVSKY M & WOLLBERG Z. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. ***Science* 242: 268-270, 1988.**
- KNOTT PG, FERNANDES LB, HENRY PJ & GOLDIE RG. Influence of endothelin-1 on cholinergic nerve-mediated contractions and acetylcholine release in rat isolated tracheal smooth muscle. ***J Pharmacol Exp Ther* 279(3): 1142-7, 1996.**
- KNOTT PG, FERNANDES LB, HENRY PJ & GOLDIE RG. Influence of endothelin-1 on cholinergic nerve-mediated contractions and acetylcholine release in rat isolated tracheal smooth muscle. ***J Pharmacol Exp Ther* 279: 1142-47, 1996.**
- KRUSE-ELLIOTT K & OLSON NC. Role of leukotrienes during oleic acid-induced lung injury in pigs. ***J Appl Physiol* 68(4): 1367-90, 1990.**
- KURIHARA H, YOSHIZUMI M, SUGIYWA T, TAKAKU F, YANAGISAWA W, MASAKI T, HAMAOKI M, KATO H & YAZAKI Y. Transforming growth factor-stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. ***Biochem Biophys Res Commun* 159: 1435-40, 1989.**
- KUROSE I, MIURA S, FUKUMURA D & TSUCHIYA M. Mechanisms of endothelin-induced macromolecular leakage in microvascular beds of rat mesentery. ***Eur J Pharmacol* 250(1): 85-94, 1993.**
- LACHMANN B, ROBERTSON B & VOGEL J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. ***Acta Anaesth Scan* 24: 231-6, 1980.**
- LaDOUCEUR DM, FLYNN MA, KEISER JA, REYNOLDS E & HALEEN SJ. ET_A and ET_B receptors coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. ***Biochem Biophys Res Commun* 196(1): 209-15, 1993.**
- LAMY P, FALLAT RJ & KOENIGER. Pathologic features and mechanisms of hypoxia in ARDS. ***Am Rev Respir Dis* 114: 267-84, 1976.**

- LANGLEBEN D, DEMARCHIE M, LAPORTA D, SPANIER AH, SCHLESINGER RD & STEWART DJ. Endothelin-1 in Acute Lung Injury and the Adult Respiratory Distress Syndrome. ***Am Rev Respir Dis* 148: 1646-50, 1993.**
- LEE HK, LEIKAUF GD & SPERELAKIS N. Electromechanical effects of endothelin on ferret bronchial and tracheal smooth muscle. ***J Appl Physiol* 68: 417-20, 1990.**
- LEEMAN M, BOEYNAEMS JM, DEGAUTE JP, VINCET JL & KAHN RJ. Administration of dazoxiben, a selective thromboxane synthetase inhibitor, in the adult respiratory distress syndrome. ***Chest* 87(6): 726-30, 1985.**
- LESUR O, BERTHIAUME Y, BLAISE G, DAMAS P, DELAND E, GUIMOND J-G & MICHEL RP. Acute respiratory distress syndrome: 30 years later. ***Can Respir J* 6(1): 71-86, 1999.**
- LIPPTON HL, COHEN GA, KNIGHT M, McMURTRY IF, GILLOT D, ARENA F, SUMMER W & HYMAN AL. Evidence for distinct endothelin receptors in the pulmonary vascular bed *in vivo*. ***J cardiovasc Pharmacol* 17(Suppl7): S370-3, 1991.**
- LÓPEZ-FARRÉ A, MOÑTANES I, MILLÂS I & LÓPEZ-NOVOA JM. Effect of endothelin on renal function in rats. ***Eur J Pharmacol* 163: 187-9, 1989.**
- LOPEZ-FARRE A, RIESCO A, ESPINOSA G, CEMADAS MR, ALVAREZ V, MONTON M, RIVAS F, GALLEGU MJ & EGIDO J. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. ***Circulation* 88(3): 1166-71, 1993.**
- LOSSOS IS, IZBICKI G, OR R, GOLDSTEIN RH & BREUER R. The effects of suramin on bleomycin-induced lung injury. ***Life Sci* 67(23): 2873-81, 2000.**
- MACCUMBER MW, ROSS CA, GLASER BM & SNYDER SH. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. ***Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7285-89, 1989.**
- MACLEAN MR, McCULLOCH KM & BAIRD M. Endothelin ET_A- and ET_B-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. ***J Cardiovasc Pharmacol* 23(5): 838-45, 1994.**
- MACLEAN. Endothelin-1: a mediator of pulmonary hypertension ? ***Pulm Pharmacol Ther* 11: 125-32, 1998.**

- MANN J, FARRUKH IS & MICHAEL JR. Mechanisms by which endothelin-1 induces pulmonary vasoconstriction in the rabbit. ***J Appl Physiol* 71(2): 410-6, 1991.**
- MATASUMOTO K, TAKI F & KONDOH Y. Platelet activating factor in bronchoalveolar lavage of patients with the adult respiratory distress syndrome. ***Clin Exp Pharm Physiol* 19: 509-15, 1992.**
- MATTHAY MA, ESCHENBACHER WL & GOETZL EJ. Elevated concentrations of leukotriene D4 in pulmonary edema fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. ***J Clin Immunol* 4(6): 479-83, 1984.**
- MATTOLI S, SOLOPERTO M, MARINI M & FASOLI A. Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction. ***J Allergy Clin Immunol* 88: 376-84, 1991.**
- McKAY KO, ARMOUR CL & BLACK JL. Endothelin-3 increases transmission in the rabbit pulmonary parasympathetic nervous system. ***J Cardiovasc Pharmacol* 22(Suppl 8): S181-S184, 1993.**
- McLEOD LJ. The Staff of the Department of Pharmacology University of Edinburgh. Pharmacological Experiments on Intact Preparations. E. & S. Livingstone, Edinburgh and London, **1970.**
- MELOT C, LEJEUNE P, LEEMAN M, MORAINÉ JJ & NAEIJE R. Prostaglandin E1 in the adult respiratory distress syndrome. Benefit for pulmonary hypertension and cost for pulmonary gas exchange. ***Am Rev Respir Dis* 139(1):106-10, 1989.**
- METZ C & SIBBALD WJ. Anti-inflammatory therapy for acute lung injury. A review of animal and clinical studies. ***Chest* 100(4): 1110-9, 1991.**
- MIAMORI I, TAKEDA Y, YONEDA T, IKI T & TAKEDA R. Interleukin-2 enhances the release of endothelin-1 from the rat mesenteric artery. ***Life Sci.* 49: 1295-300, 1991.**
- MICHAEL JR & MARKEWITZ BA. Endothelin and the lung. ***Am J Respir Care Med* 154(3 Pt): 555-81, 1996.**
- MILLER E, COHEN A, NAGAO S, GRIFFITH D, MAUNDER RJ, MARTIN TR, WEINER-KRONISH JP, STICHERLING M, CHRISTOPHERS E & MATTHAY MA. Elevated levels of NAP-1/IL-8 are present in the air spaces of patients with ARDS and are associated with increased mortality. ***Am Rev Respir Dis* 146: 427-32, 1992.**

- MILLER EJ, COHEN AB & MATTHAY MA. Increased interleukin-8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis. ***Crit Care Med* 24: 1448-54, 1996.**
- MINKES RK, BELLAN JA, SAROYAN RM, KERSTEIN MD, COY DH, MURPHY WA, NOSSAMAN BD, McNAMARA DB & KADOWITZ PJ. Analysis of cardiovascular and pulmonary responses to endothelin-1 and endothelin-3 in the anaesthetized cat. ***J Appl Physiol* 253(3): 1118-25, 1990.**
- MIOTLA JM, JEFFERY PK & HELLEWELL PG. Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. ***Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 197-204, 1998a.**
- MIOTLA JM, TEIXEIRA MM & HELLEWELL PG. Suppression of acute lung injury in mice by an inhibitor of phosphodiesterase type 4. ***Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 411-20, 1998b.**
- MITSUOKA H, UNNO N, SAKURAI T, KANEKO H, SUZUKI S, KONNO H, TERAOKAWA S & NAKAMURA S. Pathophysiological role of endothelins in pulmonary microcirculatory disorders due to intestinal ischemia and reperfusion. ***J Surgical Research* 87: 143-51, 1999.**
- MIYAMORI I, TAKEDA Y, YONEDA T, IKI K & TAKEDA R. Interleukin-2 enhances the release of endothelin from the rat mesenteric artery. ***Life Sci* 49(18): 1295-300, 1991.**
- MONTANER JSG, TSANG J, EVANS KG, MULLEN JBM, BURNS AR, WALKER DC, WIGGS B & HOGG JC. Alveolar epithelial damage: a critical difference between high pressure and oleic acid-induced low pressure pulmonary edema. ***J Clin Invest* 77: 1786-96, 1986.**
- MORIUCHI H, ARAI I & YUIZONO T. Tranexamic acid attenuates oleic-acid-induced pulmonary extravasation. ***Intensive Care Med* 21: 1003-8, 1995.**
- MORIUCHI H, ZAHA M, FUKUMOTO T. & YUIZONO T. Activation of polymorphonuclear leukocytes in oleic acid-induced lung injury. ***Intensive Care Med* 24: 709-15, 1998.**
- MOTOHIRO A, FURUKAWA K, YASUMOTO K & INOKUCHI K. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. ***Eur Surg Res* 18: 50-7, 1986.**

- MULLOL J, CHOWDHURY BA, WHITE MV, OHKUBO K, RIEVES RD, BARANIUK J, HAUSFELD JN, SHELHAMER JH, KALINER MA. Endothelin in human nasal mucosa. ***Am J Respir Cell Mol Biol* 8: 393-402, 1993.**
- MURRAY JF, MATTHAY MA, LUCE JM & FLICK MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. ***Am Rev Dis* 138: 720-3, 1988.**
- NAKANO J, TAKIZAWA H, OHTOSHI T, SHOJI S, YAMAGUCHI M, ISHII A, YANAGISAWA M & ITO K. Endotoxin and pro-inflammatory cytokines stimulate endothelin-1 expression and release by airway epithelial cells. ***C Exp Allergy* 24(4): 330-6, 1994.**
- NINOMIYA H, UCHIDA Y, NOMURA A, KAMEYAMA M, SAOTOME M, ENDO T & HASEGAWA S. Endotoxin stimulates endothelin release from cultured epithelial cells of guinea pig trachea. ***Eur J Pharmacol* 203: 299-02, 1991.**
- NINOMIYA H, UCHIDA Y, SAOTOME M, NOMURA A, OHSE H, MATSUMOTO H, HIRATA F & HASEGAWA S. Endothelins constrict guinea pig trachea by multiple mechanisms. ***J Pharmacol Exp Ther* 262: 570-6, 1992.**
- NOVERAL JP, ROSENBERG SM, ANBAR RA, PAWLOWSKI NA & GRUNSTEIN MM. Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured rabbit airway smooth muscle cells. ***Am J Physiol* 263: L317-L324, 1992.**
- OKADA M, YAMASHITA C, OKADA M & OKADA K. Constriction of endothelin-1 to warm ischemia/reperfusion injury of the rat lung. ***Am J Respir Crit Care Med* 152(6 Pt 1): 2105-10, 1995.**
- OLANOFF LS, REINES HD, SPICER KM & HALUSHKA PV. Effects of oleic acid on pulmonary capillary leak and thromboxanes. ***J Surg Res* 36(6): 597-605, 1984.**
- PANARETTO KS, PHILLIPS C & BEREND N. Effects of indomethacin and PEEP on oleic acid induced pulmonary oedema in rabbits. ***Eur Respir J* 4: 853-9, 1991.**
- PARSONS EP. Complement, endotoxin and acute lung injury. In: Evans TW & Haslett C, Eds. ARDS: Acute Respiratory Distress in Adults. London: Chapman & Hall Medical, **1996.**
- PAYNE AN & WHITTLE BJ. Potent cyclo-oxygenase-mediated bronchoconstrictor effects of endothelin in the guinea pig *in vivo*. ***Eur J Pharmacol* 158(3): 303-4, 1988.**
- PELTIER LF. Fat embolism: a pulmonary disease. ***Surgery* 62: 756-8, 1967.**

- PERREAULT T & De-MARTE J. Endothelin-1 has a dilator effect on neonatal pig pulmonary vasculature. ***J Cardiovasc Pharmacol* 18(1): 43-50, 1991.**
- PONS F, LOQUET I, TOUVAY C, ROUBERT P, CHABRIER PE, MENCIA-HUERTA JM & BRAQUET P. Comparison of the bronchopulmonary and pressor activities of endothelin (ET) isoforms ET-1, ET-2 and ET-3 and characterization of their lung binding sites in the guinea-pig lung. ***Am Rev Resp Dis* 143:294-300, 1991.**
- POULAT P & COUTURE R. Increased pulmonary vascular permeability and oedema induced by intrathecally injected endothelins in rat. ***Eur J Pharmacol* 344(2-3): 251-9, 1998.**
- RAE GA & HENRIQUES MGMO. Endothelins in inflammation. In: Proinflammatory and anti-inflammatory peptides. Ed. Said SI. Marcel Dekker, Inc., **1998.**
- RAE GA, CALIXTO JB & D'ORLÉANS-JUSTE, P. Effects and mechanisms of action of endothelins on non-vascular smooth muscle of the respiratory, gastrointestinal and urogenital tracts. ***Regulatory Peptides* 55: 1-46, 1995.**
- REDINGTON AE, SPRINGALL SR, GHATEI MA, LAU LC, BLOOM SR, HOLGATE ST, POLAK JM & HOWARTH PH. Endothelin in bronchoalveolar lavage fluid and its relation to airflow obstruction in asthma. ***Am J Respir Crit Care Med* 151: 1034-39, 1995.**
- RENNICK RE, MILNER P & BURNSTOCK G. Thrombin stimulates release of endothelins and vasopressin, but not substance P, from isolated rabbit tracheal epithelial cells. ***Eur J Pharmacol* 230: 367-70, 1993.**
- RICCIO MM, REYNOLDS CJ, HAY DWP & PROUD D. Effects of intranasal administration of endothelin-1 to allergic and nonallergic individuals. ***Am Respir Crit Care Med* 152: 1757-64, 1995.**
- ROSSAINT R, FALKE KJ, LOPEZ F, SLAMA K, PISON U & ZAPOL WM. inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. ***N Engl J Med* 328(6): 399-405, 1993.**
- ROSSAINT R, FALKE KJ, LOPEZ F, SLAMA K, PISON U & ZAPOL WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. ***N Engl J Med* 328(6): 399-405, 1993.**
- ROSTAGNO C, GENSINI GF, BONCINELLI S, MARSILI M, CASTELLANI P, MERCIAI V, LINDEN M, CHELUCCI GL & CRESCI F. The prominent role of

- thromboxane A2 formation on early pulmonary hypertension induced by oleic acid administration in sheep. *Thromb Res* **58(1): 35-45, 1990.**
- ROZENGURT N, SPRINGALL DR & POLAK JM. Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. *J Pathol* **160: 5-8, 1990.**
- RUSSEL JA, RONCO JJ & DODEK PM. Physiology effects and side effects of prostaglandin E1 in the adult respiratory distress syndrome. *Chest* **97: 684-92, 1990.**
- SAIDA K, MITSUI Y & ISHIDA P. A novel peptide vasoactive intestinal contractor of the endothelin peptide family. *J Biol Chem* **264: 1413-16, 1989.**
- SALEH D, FURUKAWA K, TSAO MS, MAGHAZACHI A, CORRIN B, YANAGISAWA M, BARNES PJ & GIAID A. Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of pro-inflammatory cytokines. *Am Respir Cell Mol Biol* **16: 187-93, 1997.**
- SAMPAIO AL, RAE GA & HENRIQUES MG. Participation of endogenous endothelins in delayed eosinophil and neutrophil recruitment in mouse pleurisy. *Inflamm Res* **49(4): 170-6, 2000a.**
- SAMPAIO AL, RAE GA & HENRIQUES MM. Role of endothelins on lymphocyte in allergic pleurisy. *J Leukoc Biol* **67(2): 189-95, 2000b.**
- SAOTOME M, NINOMIYA H, NOMURA A, OHSE H, ENDOH T, HASEGAWA S & UCHIDA Y. Endothelin-1 induced relaxation of guinea pig trachea after an anaphylactic reaction. *Arerugi* **40(11): 1377-83, 1991.**
- SCHINI VB, HENDRICKSON H, HEUBLEIN DM, BURNET JC Jr & VANHOUTTE PM. Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* **165(2-3): 333-4, 1989.**
- SCHUSTER DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **149: 245-60, 1994.**
- SCHWEIZER A, VALDENAIRE O, NELBOCK P, DEUSCHLE U, DUMAS MILNE EDWARDS JB, STUMPF JG & LOFFLER BM. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): tree isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* **15(Pt 3): 871-7, 1997.**

- SELIG WM, PATTERSON CE & RHOADES RA. Cyclooxygenase metabolites contribute to oleic acid-induced lung edema by a pressure effect. ***Exp Lung Res* 13(1): 69-82, 1987.**
- SESSA WC, KAW S, HECKER M & VANE JR. The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. ***Biochem Biophys Res Commun* 174(2): 613-8, 1991.**
- SHERR S & GERTNER S. Production and recovery of pulmonary fat emboli in dogs. ***Exp Mol Pathol* 21: 63-73, 1974a.**
- SHERR S, MONTEMURNO R. & RAFFER P. Lipids of recovered pulmonary fat emboli following trauma. ***J Trauma* 14(3): 242-6, 1974b.**
- SHI X, DING M, CHEN F, WANG L, RAJANASAKUL Y, VALLYATHAN V & CASTRANOVAL V. Reactive oxygen species and molecular mechanism of silica-induced lung injury. ***J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20(suppl. 1): 85-93, 2001.**
- SHICHIRI M, HIRATA Y, NAKAJIMA T, ANDO K, IMAI T, YANAGISAWA M, MASAKI T & MARUMO F. Endothelin-1 is a autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. ***J Clin Invest* 87: 1867-71, 1991.**
- SILVERMAN HJ, SLOTMAN G, BONE RC, MAUNDER R, HYERS TM, KERSTEIN MD & URSPRUNG JJ. Effects of prostaglandin E1 on oxygen delivery and consumption in patients with the adult respiratory distress syndrome. Results from the prostaglandin E1 multicenter trial. The prostaglandin E1 study group. ***Chest* 98(2): 405-10, 1990.**
- SIMMET T, PRITZE P, THELEN KI & PESKAR BA. Release of endothelin in the oleic acid-induced respiratory distress syndrome in rats. ***Eur J Pharmacol* 211: 319-22, 1992.**
- SIPAHI E, HODOGLUGIL U, ERCAN ZS & TÜRKER RK. Acute effect of endothelin-1 on lung oedema induced by alpha-naphthylthiourea (ANTU). ***Pharmacol Research* 33(6): 375-8, 1996.**
- SIROIS MG, FILEP JG, ROUSSEAU A, FOURNIER A, PLANTE GE & SIROIS P. Endothelin-1 enhances vascular permeability in conscious rats: role of thromboxane-A₂. ***Eur J Pharmacol* 214: 119-25, 1992.**

- SMITH DR, STRIETER M & KUNKEL SL. Cytokines and lung injury. In.: EVANS TW & HASLETT C, Eds. ARDS: Acute Respiratory Distress in Adults. London: Chapman & Hall Medical, **1996**.
- SOFIA M, MORMILE M, FARAOME S, ALIFANO M, ZOFRA S, ROMANO L & CARRATU L. Increased endothelin-like immunoreactive material on bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma and patients with interstitial lung disease. ***Respiration* 60: 89-95, 1993**.
- SOKOLOVSKY M. Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signalling. ***Pharm Ther* 54: 129-49, 1992**.
- SPRAGG RG, ABRAHAM JL & LOOMIS WH. Pulmonary platelet deposition accompanying acute oleic-acid-induced pulmonary injury. ***Am Rev Respir Dis* 126: 553-7, 1982**.
- SPRAGG RG, ABRAHAM JL & LOOMIS WH. Pulmonary platelet deposition accompanying acute oleic acid-induced pulmonary injury. ***Am Rev Respir Dis* 126(3): 553-7, 1982**.
- SPRINGALL DR, HOWAERTH PH, COUNIHAN H, DJUKANOVIC R, HOLGATE ST & POLAK JM. Endothelin immunoreactivity of airway epithelium in asthmatic patients. ***Lancet* 337: 697-701, 1991**.
- STAMMBERGER U, CARBONNI GL, HILLINGER S, SCHNNEITER D, WEDER W & SCHMITH RA. Combined treatment with endothelin- and PAF-antagonists reduces post-transplant lung ischemia/reperfusion injury. ***J Heart Lung Transplant* 18: 862-8, 1999**.
- STAUB NC. Pulmonary edema following microemboli. ***Semin Respir Med* 3: 102-7, 1981**.
- STEINBERG SM, RODRIGUEZ JL, BITZER LG, RHEE JW, KELLEY KA & FLINT LM. Indomethacin treatment of human adult respiratory distress syndrome. ***Circ Shock* 30(4): 374-84, 1990**.
- STELZNER TJ, O'BRIEN RF, YANAGISAWA M, SAKURAI T, SATO K, WEBB S, ZAMORA M, McMURTRY IF & FISHER JH. Increased lung endothelin-1 production in rats with idiopathic pulmonary hypertension. ***Am J Physiol* 262(5 Pt 1): L1614-20, 1992**.

- STEPHENSON AH, LONIGRO AJ, HOLMBERG SW & SCHUSTER DP. Eicosanoid balance and perfusion redistribution of oleic acid-induced acute lung injury. **J Appl Physiol** 73(5): 2126-34, 1992.
- STEWART AG, GRIGORIADIS G & HARRIS T. Mitogenic actions of endothelin-1 and epidermal growth factor in cultured airway smooth muscle. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 21: 277-285, 1994.
- STEWART DJ, LEVY RD, CERNACEK P & LANGLEBEB D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease ? **Ann Intern Med** 114(6): 464-9, 1991.
- STHEFENSON AH, LONIGRO AJ, HYERS TM, WEBSTER RO & FOWLER AA. Increased concentration of leukotrienes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS or risk for ARDS. **Am Rev Respir Dis** 138(3): 714-9, 1988.
- SUGIURA M, INAGAMI T & KON V. Endotoxin stimulates endothelin-release *in vivo* and *in vitro* as determined by radioimmunoassay. **Biochem Biophys Res Commun** 161: 1220-27, 1989.
- SYRBU S, THRALL RS, WISNIECKI P, LIFCHEZ S & SMILOWITZ M. Increased immunoreactive rat lung ICAM-1 in oleic acid-induced lung injury. **Exp Lung Res** 21: 599-616, 1996.
- TACHMES L, ADLER H, WOLOSZYN TT, COON MS, DAMIANI P, MARINI CP & HOROVITZ J. Role of arachidonic acid metabolites in oleic acid induced pulmonary injury in a canine model. Effect of ketoconazole (thromboxane synthase inhibitor). **Am Surg** 57(3): 171-7, 1991.
- TANAHASHI Y, TAKEYOSHI I, AIBA M, OHWADA S, MATSUMOTO K & MORISHITA Y. The effects of FK409 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. **Transpl Int** 12: 402-7, 1999.
- THE MERCK INDEX. Twelfth Edition. Susan Budavari: Editor. Published by Merck Research Laboratories. Division of Merck & CO., Inc. Whitehouse Station, NJ. 1996.
- TOGA H, IBE BO & RAJ JU. *In vitro* responses of ovine intrapulmonary arteries and veins to endothelin-1. **Am J Physiol** 263(1 Pt 1): L15-21, 1992.
- TOGA H, USHA RAJ, HILYARD R, KU B & ANDERSON J. Endothelin effects in isolated, perfused lamb lungs: role of cicloxygenase inhibition and vasomotor tone. **Am J Physiol** 261(12 Pt 2): H443-50, 1991.

- TOMASHEFSKI JF Jr. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. ***Clin Chest Med* 11(4):593-619, 1990.**
- TOMASHEFSKI JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. ***Clin Chest Med* 21(3): 435-66, 2000.**
- TOWNSLEY MI, TAYLOR GE, KORTHUIS RJ & TAYLOR AE. Promethazine or DPPD pre-treatment attenuates oleic acid-induced injury in isolated canine lungs. ***J Appl physiol* 59(1): 39-46, 1985.**
- UCHIDA Y, NINOMIYA H, SAKAMOTO T, LEE Y, ENDO T, NOMURA A, HASEGAWA S & HIRATA D. ET-1 released histamine from guinea-pig pulmonary but not peritoneal mast cells. ***Biochem Biophys Res Commun* 189: 1106-10, 1992.**
- UCHIDA Y, NINOMIYA H, SAOTOME M, NOMURA A, OHTSUKA M, YANAGISAWA M, GOTO K, MASAKI T & HASEGAWA S. Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. ***Eur J Pharmacol* 154: 227-28, 1988.**
- VOLPE BT, LIN W & THRALL RS. Effect of intratracheal dexamethasone on oleic-induced lung injury in the rat. ***Chest* 106: 583-87, 1994.**
- VOLPE BT, LIN W & THRALL RS. Effect of intratracheal dexamethasone on oleic acid-induced lung injury in the rat. ***Chest* 106(2): 583-7, 1994.**
- WAGNER JG & ROTH RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. ***Pharmacol Rev* 52(3): 349-74, 2000.**
- WALMRATH D, SCHNEIDER T, PILCH J, GRIMMINGER F & SEEGER W. Aerosolised prostacyclin in adult respiratory distress syndrome. ***Lancet* 342(8877): 961-2, 1993.**
- WANG D, LI M-H, HSU K, SHEN C-Y, CHEN HI & LIN Y-C. Air embolism-induced lung injury in isolated rat lung. ***J Appl Physiol* 72(4): 1235-42, 1992.**
- WARE LB & MATTHAY MA. The acute respiratory distress syndrome. ***N Engl J Med* 342: 1334-49, 2000.**
- WEIKLAND JE, DORINSKY PM, DAVIS WB, LUCAS JG & GADEK JE. Validity of bronchoalveolar lavage in acute lung injury: recovered cells accurately reflect changes in the lung parenchyma. ***Pathology* 21: 59-62, 1989.**
- WEINACKER AB & VASZAR LT. Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies. ***Annu Rev Med* 52: 221-37, 2001.**

- WHITE SR, HATHAWAY DP, UMANS JG, TALLET J, ABRAHAMS C & LEFF AR. Epithelial modulation of airway smooth muscle response to endothelin-1. ***Am Rev Respir Dis* 144(2): 373-8, 1991.**
- WILHELM DL, MILL PJ, SPARROW E, MACKAY ME, MILES AA. Enzyme-like globulins from serum reproducing the vascular phenomena of inflammation: IV. Activable permeability factor and its inhibitor in the serum of rat and rabbit. ***Br J Exp Pathol* 39: 228-50, 1958.**
- WONG J, VANDERFORD PA, FINEMAN JR, CHANG R & SOIFER SJ. Endothelin-1 produces pulmonary vasodilation in the intact newborn lamb. ***Am J Physiol* 265(4 Pt 2): H1318-25, 1993.**
- WYNGAARDEN JB, SMITH, JR LH & BENNETT JC Eds. CECIL Textbook of Medicine. Philadelphia: Saunders, 2V, 19^a Edição, **1992.**
- WYPIJ DM, NICHLOS JS, NOVAK PJ, STACY DL, BERMAN J, WISEMAN JS. Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. ***Biochem Pharmacol* 43(4): 845-53, 1992.**
- YAMAGUCHI K, MASAOKI M, KAWAI A, ASANO K, TAKASUGI T, UMEDA A & YOKOYAMA T. Attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction in acute oleic acid lung injury – significance of vasodilator prostanoids. ***Advances in Experimental Medicine and Biology*. 316: 299-309, 1992.**
- YAMAMURA H, NABE T, KOHNO S & OHATA K. Endothelin-1 induces release of histamine and leukotriene C₄ from mouse bone marrow-derived mast cells. ***Eur J Pharmacol* 257: 235-42, 1994.**
- YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K & MASAKI T. A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. ***Nature* 332: 411-15, 1988.**
- YONEYAMA T, HORI M, TANAKA T, MATSUDA Y & KARAKI H. Endothelin ET_A and ET_B receptors facilitating parasympathetic neurotransmission in the rabbit trachea. ***Pharmacol Exp Ther* 275: 1084-9, 1995.**
- YUKIOKA T, YUKIOKA N, AULICK LH, GOODWIN CW, MASON AD Jr, SUGIMOTO T & PRUITT BA Jr. Evaluation of (1-sarcosine, 8-isoleucine)-angiotensin II as a therapeutic agent for oleic acid-induced pulmonary edema. ***Surgey* 99(2): 235-44, 1986.**

ZHANG L, YANG J & XU QH. Protective effect of endothelin-antiserum on oleic acid-induced respiratory distress syndrome (RDS). ***Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 16(1): 8-10, 1993.**

ZIMMERMAN RS, MARTINEZ AJ, MAYMIND M & BARBEE RW. Effect of endothelin on plasma volume and albumin escape. ***Circ Res* 70: 1027-34, 1992.**